CHARAKTERISIERUNG EINER ADENYLATCYCLASE AUS PARAMECIUM TETRAURELIA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Doris Gertrud Gierlich

aus Bergisch Gladbach

1985

CHARAKTERISIERUNG EINER ADENYLATCYCLASE AUS PARAMECIUM TETRAURELIA

CHARAKTERISIERUNG EINER ADENYLATCYCLASE AUS PARAMECIUM TETRAURELIA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Doris Gertrud Gierlich

aus Bergisch Gladbach

1985

Tag der mündlichen Prüfung:	28. 6. 1985
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. E. Schultz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Reinhard

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz angefertigt, dem ich an dieser Stelle herzlich für seine Unterstützung und sein Interesse danken möchte.

Besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Biochem. U. Schönefeld für die Übertragung des Programms zur Berechnung von Metall-Ligand-Komplexen von Fabiato u. Fabiato auf einen Apple II Europlus Computer, Herrn Dr. rer. nat. habil. H. Bisswanger für die hilfreiche Begutachtung der enzymkinetischen Untersuchungen sowie allen meinen Kollegen für die vielen weiterführenden Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGEN	1
I. EINLEITUNG	3
II. MATERIAL UND METHODEN	8
II.1. Material	8
II.2. Methoden	10
II.2.1. Züchtung	10
II.2.2. Ciliengewinnung	10
II.2.3. Herstellung von Membranvesikeln	11
II.2.4. Herauslösen der AC aus der Cilienmembran	12
II.2.5. Gelchromatographie	12
II.2.6. AC-Test	13
II.2.7. Methoden zur ^{32}P-cAMP Bestimmung	14
II.2.8. Berechnung des gebildeten cAMP's	15
II.2.9. Dünnschichtchromatographie	15
II.2.10. Autoradiographie	15
II.2.11. Proteinbestimmung nach Lowry	16
II.2.12. Lowry im Halbmikromaßstab	16
II.2.13. Berechnung der MgATP-Konzentration und der freien Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Konzentration	17
III. ERGEBNISSE	
III.1. cAMP-Bestimmung	18
III.2. STABILITÄT	21
III.2.1. Vorinkubation verschiedener Vesikelchargen	21
III.2.2. Anwesenheit eines Kofaktors während der Vorinkubation	22
III.2.3. Einfluß des pH-Wertes	22

Seite

III.2.4. Vorinkubation in Anwesenheit von cAMP, EGTA, Na_2ATP und $MnCl_2$ bzw. $MgCl_2$ 22

III.2.5. Einfluß der Temperatur 22

III.2.6. Einfluß von BSA und Proteasehemmern 23

III.2.7. Einfluß von Sucrose 24

III.2.8. Einfluß von Glycerin und DMSO 25

III.3. GLYCERINAKTIVIERUNG 29

III.3.1. Einfluß von Glycerin und DMSO auf die Aktivität des Enzyms 29

III.3.2. Vergleichende Untersuchungen zur Glycerinaktivierung in Cilien, Cilienmembranvesikeln und löslichem Enzym 30

III.3.3. Einfluß der ATP-Konzentration auf die Glycerinaktivierung 31

III.4. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG 34

III.4.1. Proteinabhängigkeit 34

III.4.2. Zeitabhängigkeit 34

III.4.3. Temperaturabhängigkeit 34

III.4.4. pH-Abhängigkeit 36

III.4.5. ATPasen und Phosphodiesterasen 37

III.5. LÖSLICHMACHEN DER AC UND WEITERE REINIGUNG 42

III.5.1. Chymotrypsinbehandlung 42

III.5.2. Detergentien 42

III.5.3. Herauslösen der AC aus der Cilienmembran 43

III.5.4. Gelchromatographie 48

III.6. HORMONE,GTP,NaF und FORSKOLIN 51

III.6.1. Hormone und Neurotransmitter 51

III.6.2. GTP 51

III.6.3. Anionen 51

Seite

III.6.4.Forskolin 52

III.7. ALLOSTERISCHE AKTIVIERUNG DER AC DURCH Mg^{2+} UND MgATP 57

III.7.1. Aufstellung eines Reaktionsschema's für die AC 57
III.7.2. K_m'- und K_A-Bestimmung 59
III.7.3. Molekularer Mechanismus der Mg^{2+}-Aktivierung 61

III.8. Ca^{2+}-HEMMUNG 67

III.8.1. Hemmechanismus 67
III.8.2. K_i-Wert Ermittlung 69
III.8.3. Hemmwirkung von La^{3+}, Ba^{2+} und Sr^{2+} 70
III.8.4. Reversibilität der Ca^{2+}-Hemmung 70

III.9. K^+-STIMULIERUNG 76

III.9.1. Stabilität der K^+-Stimulierung 76
III.9.2. Glycerindecilierung 77
III.9.3. Faktoren ohne Einfluß auf die K^+-Aktivierung 78
III.9.4. Einfluß der freien Mg^{2+}-Konzentration 78
III.9.5. KCl-Dosiswirkungskurven 79
III.9.6. Beeinflußung von K_m^A und V_{max} durch KCl 79
III.9.7. K_i-Wert für Calcium mit 20 mM KCl 80

DISKUSSION 91

ZUSAMMENFASSUNG 100

LITERATURVERZEICHNIS 101

ABKÜRZUNGEN

AC	Adenylatcyclase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	3',5'-Guanosinmonophosphat
Chaps	3-{(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino}-1-propansulfonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glycolether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GC	Guanylatcyclase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IBMX	1-Isobutyl-3-methylxanthin
KK	Kreatinkinase
KP	Kreatinphosphat
2-ME	2-Mercaptoethanol
MG	Molekulargewicht
Mops	N-Morpholino-3-propansulfonsäure
N_i	inhibitorisches GTP-bindendes Protein
N_s	stimulierendes GTP-bindendes Protein
NS	Niederschlag
PDE	Phosphodiesterase

PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Squibb 66007	1-Acetyl-9-ethyl-6-ethylmercapto-1-desazapurin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEA^+	Tetraethylammoniumion
TLCK	7-Amino-1-chlor-3-(p-tosylamido)-2-heptanonhydrochlorid
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ÜS	Überstand

Abkürzungen zur Enzymkinetik

A	Aktivator
I	Inhibitor
E	Enzym
K_A	Dissoziationskonstante des EA-Komplexes
K_i	Dissoziationskonstante des EI-Komplexes
K_m^A	Michaelis Menten Konstante bei einer bestimmten Aktivatorkonzentration
K_m	Michaelis Menten Konstante
S	Substrat
v	Geschwindigkeit
V_{max}	maximale Geschwindigkeit
V_{maxi}	maximale Geschwindigkeit bei einer bestimmten Inhibitorkonzentration

I. EINLEITUNG

Paramecium, gemeinhin als Pantoffeltier bezeichnet, ist ein eukaryoter Süßwasserciliat und gehört zu den am weitesten differenzierten Protozoen. Die hier verwendete Species Paramecium tetraurelia besitzt eine durchschnittliche Größe von 100 x 40 µm und ist mit ca. 5000 Cilien bedeckt. Von diesen Cilien befinden sich 10 % in der Mundregion und dienen der Nahrungsaufnahme. Die restlichen Cilien sind über den gesamten Körper verteilt. Sie sind für die Fortbewegung verantwortlich. Den inneren Teil der Cilien bilden die Axonemata mit der typischen 9 + 2 Anordnung. Ihr Dynein/Tubulin System ist ähnlich dem Actin/Myosin System in höheren Organismen verantwortlich für die Bewegung. Die Axonemata werden nach außen durch eine Membran abgeschlossen (1).
Paramecium dient als Forschungsobjekt für elektrophysiologische, neurobiologische und verhaltensphysiologische Vorgänge, die bei der Reiz- und Erregungsleitung ablaufen. Da die Entstehung des Ca^{2+}/ K^{+}-Aktionspotentials ausschließlich in den Cilien stattfindet (2), kommt der Aufklärung dieser Vorgänge in den Cilien eine besondere Bedeutung zu. Wegen der Verwandtschaft zu Sehstäbchen, Cilien im Innenohr, Spermien und Geißeln kann die Aufklärung der Reiz- und Erregungsleitung bei Paramecium Modellcharakter für möglicherweise vergleichbare Prozeße in diesen Systemen annehmen.
Im Normalzustand schwimmt das Pantoffeltier vorwärts. Das Membranpotential beträgt in diesem Zustand -30 mV. Dieses Ruhepotential wird durch aktiven Transport von Ca^{2+} aus der Zelle und K^{+} in die Zelle aufrechterhalten (3).
Chemische, elektrische, thermische und mechanische Reize bewirken eine Änderung des Schwimmverhaltens (4). Das Tier schwimmt durch Cilienschlagumkehr für 0,1 - 1 Sekunde rückwärts, dreht sich um einen Winkel von ca. 60° und schwimmt dann in dieser neuen Richtung normal vorwärts (5).

Mechanische Reize werden über gesonderte Mechanorezeptoren wahrgenommen. Hierbei entsteht ein Rezeptorpotential, das ab einem Schwellenwert von -10 mV zur Entstehung eines graduierten Ca^{2+}/ K^{+}-Aktionspotentials führt (6).
Im Zusammenhang mit der Entstehung des Ca^{2+}/ K^{+}-Aktionspotentials kommt es zur Öffnung der spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanäle, die sich nur in der Cilienmembran befinden (2).
Auf diese Weise steigt die interne Ca^{2+}-Konzentration innerhalb von 8 msec von 10 - 100 nM auf eine Konzentration von ca. 10 µM an und es kommt infolgedessen zur Schlagumkehr der Cilien. Der mechanische und biochemische Mechanismus der Schlagumkehr ist noch nicht geklärt (7). Nach 5 - 10 msec beginnt dann durch einen potentialabhängigen K^{+}-Ausstrom die Repolarisation. Die Ca^{2+}-Kanäle werden durch den erhöhten Ca^{2+}-Einstrom inaktiviert (8), und die interne Ca^{2+}-Konzentration wird mit Hilfe von ATPasen wieder auf eine Konzentration von 10 - 100 nM eingestellt (9,10).
Ebenso wie das Rückwärtsschwimmen durch hohe interne Ca^{2+}-Konzentrationen ausgelöst wird, so scheint auch die Schlaggeschwindigkeit abhängig von der internen Ca^{2+}-Konzentration zu sein. Die Schlaggeschwindigkeit wird erhöht durch Depolarisation bis zu +5 mV und durch Hyperpolarisation (8).
Weiterhin wird sie durch hohe Ca^{2+}- bzw. niedrige K^{+}-Konzentrationen im Außenmedium erhöht (11). Alle diese Bedingungen sollen zu einer Erhöhung der internen Ca^{2+}-Konzentrationen führen (11). Untermauert wird diese These durch Versuche mit Triton behandelten Tieren, die durch Zugabe submikromolekularer Konzentrationen von Ca^{2+} ihre Schlaggeschwindigkeit erhöhen (12).
Ca^{2+} und K^{+} scheinen eine Schlüsselrolle in der Reizweiterverarbeitung zu spielen. Es erhebt sich nun die Frage, über welche Enzyme die durch Ca^{2+} und K^{+} vermittelten Signale verarbeitet werden - welche biochemischen Prozesse schließlich zu einer Schlagfrequenzerhöhung bzw. zur Schlagumkehr führen.

In unserem Labor wurden Studien durchgeführt, die im Zusammenhang mit dem cyclischen Nukleotidsystem der Cilien von Paramecium tetraurelia stehen. So wurde eine in der Cilienmembran lokalisierte AC und GC gefunden. Die GC ist Ca^{2+}-Calmodulin abhängig (13). Geringe Ca^{2+}-Konzentrationen im Bereich von 5 - 100 µM aktivieren dieses Enzym, höhere Ca^{2+}-Konzentrationen hemmen. Weiterhin befinden sich in den Cilien zwei cAMP-abhängige Proteinkinasen, eine cGMP-abhängige Proteinkinase, verschiedene dazugehörige Substratproteine (14,15), die Phosphoproteinphosphatase 2B (Calcineurin) (16) und schließlich eine cAMP- und eine cGMP-PDE (17).

Mit Hilfe von cyclischen Nukleotidspiegelmessungen in vivo und der genaueren Charakterisierung der Enzyme des cyclischen Nukleotidsystems in vitro wird versucht, die Rolle der einzelnen Enzyme und die Funktion von cAMP und cGMP im Rahmen der biochemischen Reizübertragung aufzuklären.

So konnte gezeigt werden, daß der Anstieg der cAMP-Spiegel in vivo abhängig von dem Donnan-Verhältniss $K^+/\sqrt{Ca}^{2+}$ ist und daß weder Na^+ noch Li^+ und TEA^+ Kaliumionen ersetzen können (18).

Auch eine Korrelation zwischen cAMP-Spiegelhöhe und Schwimmgeschwindigkeit wird postuliert. So führt Hyperpolarisation zu einem Anstieg der cAMP-Spiegel, während nach Depolarisierung der cAMP-Spiegel sinkt (19).

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, die für die cAMP-Bildung verantwortliche AC in vitro zu charakterisieren und mögliche Regulationsmechanismen aufzuklären.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß dieses Enzym in der Cilienmembran lokalisiert ist. Verteilungsstudien mit Cilienmembranvesikel in einem Perkollgradienten hatten gezeigt, daß 50 % der AC-Gesamtaktivität in Vesikeln mit niederer Dichte und 50 % in Vesikeln mit höherer Dichte lokalisiert ist (20). Das Enzym zeigte einen extrem ausgeprägten pH-Anstieg von pH 6 - 8 und die spezifische Aktivität, die mit 1 mM $MnCl_2$ und 200 µM ATP erreicht wurde, lag um das 10-fache

über der mit 10 mM $MgCl_2$ und 200 µM ATP erhaltenen. Anhaltspunkte für eine mögliche Regulation lagen keine vor (21).

Hormonsensitive ACen höherer Systeme besitzen 3 funktionelle Einheiten (44):

1) einen Rezeptor, der an der Außenseite der Membran lokalisiert ist. Bindung von Hormonen oder Neurotransmittern an diesen Rezeptor kann zur Stimulierung oder zur Hemmung der AC führen.
2) zwei GTP-bindende Proteine, die mit N_s und N_i bzw. G_s und G_i bezeichnet werden. Sie bestehen wiederum aus 3 Untereinheiten:
   α_s (MG 45 000) bzw. α_i (MG 41 000),
   β (MG 35 000) und γ (MG 10 000).
3) die katalytische Einheit C, an der letztendlich die Bildung von cAMP stattfindet.

Folgendes Regulationsmodell wird zur Zeit für diese ACen diskutiert:

Bindung von Hormonen an diesen Rezeptor führt in Abhängigkeit von Mg^{2+} und GTP zur Stimulierung der N-Untereinheiten. N_s wird z.B. durch Bindung von ACTH und β-adrenergen Agonisten an die entsprechenden Rezeptoren stimuliert, N_i z.B. durch Bindung von α_2-adrenergen Agonisten und Opiaten an die entsprechenden Rezeptoren (44). Auf diese Weise stimuliertes N_s erhöht dabei die Affinität für Mg^{2+} an einer allosterischen Bindungsstelle der katalytischen Einheit C, wohingegen N_i zu einer Erniedrigung der Affinität für Mg^{2+} an dieser Bindungsstelle führen soll, was wiederum zu einer Erhöhung bzw. einer Erniedrigung der cAMP Bildung führt (22). N_s und N_i wird dabei eine GTPase-Aktivität zugeschrieben, die durch Bildung von GDP + P zu einer Desaktivierung von N_s und N_i führt (85, 86). In diesen Systemen kann Mn^{2+} sowie Mg^{2+} als Kofaktor benutzt werden. Die Basalaktivität und eine F^--stimulierte Aktivität ist höher in Anwesenheit von Mn^{2+}, Hormonstimulierung ist größer in Anwesenheit von Mg^{2+} (23). Stimulierung durch F^- wird auf die Bildung von AlF_4^-

und dessen Bindung an N_s zurückgeführt (24). Auf diese Weise wird N_s stimuliert und ist so in der Lage, die katalytische Einheit C zu aktivieren (24). Stimulierung durch F^- ist somit ein Indiz für die Anwesenheit von N_s. Keine F^--Stimulierung und kein Einfluß von Hormonen und Neurotransmittern konnte bislang für die ACen in Spermien nachgewiesen werden. Auch hier erreicht man mit Mn^{2+} als Kofaktor 10 - 20 mal höhere Aktivitäten als mit Mg^{2+} als Kofaktor (25). Weitere nicht hormonsensitive ACen findet man bei Bordetella pertussis, dem Erreger des Keuchhustens (26), Trypanosoma brucei, dem Erreger der Schlafkrankheit (27) und bei E. coli (28). Es galt nun zu klären, ob die ciliäre Paramecien-AC vergleichbar mit den hormonsensitiven ACen höherer Systeme ist oder ob sich eine Verwandtschaft zu den nicht hormonregulierten ACen herauskristallisiert.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1. Material

Chemikalien

Boehringer Mannheim	cAMP, Adenosin, Adenin, ATP, ADP, AMP alle als Na-Salz
Fluka, Neu Ulm	$LaCl_3$
ICI, Frankfurt	Lubrol PX
Merck, Darmstadt	alle nicht aufgeführten Chemikalien
Serva, Heidelberg	Brij 56, GTP (Na-Salz), IBMX, KP, PMSF, TLCK, Saccharose, Triton X 405, Dowex WX 4,
Sigma, München	Glycerin, ATP (Tris-Salz), DTT, Hepes, Mops, Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin
Squibb & Sons, Princeton	Squibb 66007
Zinser, Frankfurt	Unisolve I

Radiochemikalien

Amersham Buchler, Braunschweig	^{3}H-cAMP (38 Ci/mmol)
New England Nuclear, Dreieich	α-^{32}P-ATP (600 Ci/mmol)

Säulenmaterial

LKB, Bromma, Schweden	Ultrogel AcA 22
Pharmacia, Uppsala, Schweden	Sephacryl S 200, S 300, S 400

Proteine

Boehringer, Mannheim	BSA, KK, Trypsininhibitor
Sigma, München	α-Chymotrypsin

Geräte

Apple, Cupertino Kalifornien	Apple II Europlus Computer
Beckmann Instruments, München	Ultrazentrifuge L5-50
Du Pont de Nemours, Bad Nauheim	Zentrifuge Sorvall RC-5
Hewlett Packard	Taschenrechner HP 25
Heraeus Christ, Osterode	Zentrifuge Variofuge S
Kontron Hermle, Gosheim	Zentrifuge Centrikon H-401
LKB, Wallac Finnland	Liquid Scintillation Counter Rack Beta 1217
Pharmaz. Institut, Universität Tübingen	20 l Airlift Fermenter
Searle, Heusenstamm	Liquid Scintillation Counter Isocap 300
Westfalia, Oelde	Milchzentrifuge
Zeiss, Oberkochem	Photometer PM 6, Drucker XP2

Autoradiographie

Dr. Goos-Suprema, Heidelberg	Bleikasetten
Du Pont de Nemours, Bad Nauheim	Verstärkerfolien Quanta III
Kodak, Stuttgart	Röntgenfilm X-Omat (12x18cm) Entwickler CX 24 Fixierer AL 4

II.2. Methoden

II.2.1. Züchtung

Paramecium tetraurelia 51s Wildtyp wurde von Dr. E. Kaneshiro, Cincinnati/USA und von Dr. C. Kung, Madison/USA zur Verfügung gestellt. Die Züchtung erfolgte unter axenischen Bedingungen, die im Prinzip den von J. Thiele beschriebenen entsprachen (29). Vorkulturen wurden mit 6 x 30 ml logarithmischen Zellen in 6 x 300 ml Medium angesetzt. Das Medium befand sich in 1 L Erlenmeyerkolben. Nach 2 Tagen wurde diese Vorkultur in einen 20 L Fermenter überimpft, der 19 L Medium enthielt. Nach weiteren 3 - 4 Tagen erhielt man eine stationäre Kultur, die bei einem pH-Wert zwischen 7,35 und 7,45 geerntet wurde.

II.2.2. Ciliengewinnung

Die Pantoffeltiere wurden mit Hilfe einer Milchzentrifuge bei 300 g vom Medium abgetrennt. Dazu waren 3 Läufe mit je 7 L notwendig, wobei die Tiere nach jedem Lauf noch in der Milchzentrifuge mit je 400 ml Dryls-Lösung (1 mM NaH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 2 mM NaCitrat, 1,5 mM $CaCl_2$, pH 7,2, 20°C) gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 L Dryls aufgenommen, in einer Christ-Zentrifuge 5 min bei 380 g abzentrifugiert und in 300 ml Lösung A (150 mM Sucrose, 4 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM Mops pH 7,2, 0°C) resuspendiert.

a) Ca-Schock-Decilierung nach Gibbons (30)

In 3 Kolben mit je 500 ml Lösung B (150 mM Sucrose, 4 mM NaCl, 5,4 mM EDTA, 625 mM Glycerin, 15 mM Mops, pH 8,3, 0°C) wurden jeweils 100 ml der Tiere in Lösung A 10 min eingeweicht, mit 5 ml $CaCl_2$-Lösung (3 M) versetzt und kräftig geschüttelt. Durch Zentrifugation bei 160 g und 650 g (jeweils für 10 min) wurden die Cilien von den Zellkörpern

abgetrennt. Die dabei im Überstand verbleibenden Cilien wurden bei 5900 g abzentrifugiert, in 80 ml Lösung A resuspendiert, nochmals bei 500 g 10 min von weiteren Zellbestandteilen befreit und bei 8000 g 30 min abzentrifugiert. Die so erhaltenen Cilien wurden zur Weiterverarbeitung in Vesikel in 10 mM NaMops pH 7,2 resuspendiert.

b) Glycerindecilierung nach Gibbons (31)

1 ml Pantoffeltiere wurden vom Medium abgetrennt und mit 10 ml 0,18 % NaCl-Lösung in 0,2 M Sucrose vorsichtig gewaschen. Beide Zentrifugationen erfolgten bei 380 g 5 min in einer Christ-Zentrifuge. Die gewaschenen Pantoffeltiere wurden in 10 ml einer Lösung bestehend aus 70 % Glycerin, 50 mM KCl bzw. NaCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 25 mM Tris/Mops-Puffer pH 8,3 bei 0°C resuspendiert und für 12 Std. bei -20°C gelagert. Die Cilien wurden bei 200 g und 700 g (10 min) von den Zellkörpern abgetrennt. Die sich dann im Überstand befindenden Cilien wurden bei 15 000 g (30 min) abzentrifugiert.

II.2.3. Herstellung der Membranvesikel

Das Abtrennen der Cilienmembran erfolgte nach der Methode von Adoutte et al. (32).
Cilien wurden in 10 mM NaMops pH 7,2 30 min bei 0°C stehengelassen. Die auf diese Weise geschwollenen Cilien wurden 2 min mit Hilfe eines Vortex-Whirlmix kräftig geschüttelt. Die dabei entstandenen Membranvesikel wurden von den Axonemata über einen Sucrosegradienten nach Adoutte getrennt. Der Sucrosegradient bestand aus 3 ml 55 % (w/w), 5 ml 45 % (w/w) und 2 ml 55 % (w/w) Sucroselösung in 2,5 mM Tris/Mops-Puffer pH 7,4. Dieser Gradient wurde mit 3 ml Cilienprotein, entsprechend ca. 60 mg Protein, beladen und 3 Stunden bei 100 000 g in einem Beckmann SW 40.1 Rotor zentrifugiert. Die Vesikelbande, die sich auf der 45 %-igen Sucrosebande befand, wurde vorsichtig abgesaugt, im zehnfachen Volumen Tris/Mops-Puffer (5 mM, pH 7,4) aufgenommen, 30 min bei

48 000 g abzentrifugiert und mit 2,5 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Der Proteingehalt wurde dabei auf eine Proteinkonzentration von ca. 1,5 mg/ml eingestellt. Die Ausbeute an Membranvesikeln betrug durchschnittlich 3,75 mg Vesikelprotein/60mg Cilienprotein.

II.2.4. Herauslösen der AC aus der Cilienmembran

Um die AC aus der Membran herauszulösen, wurden zunächst 9 ml Vesikel (= ca. 14 mg Protein) mit 1 ml 10 %iger Brij 56-Lösung versetzt, bei 50 000 g 30 min abzentrifugiert und der dabei entstandene Niederschlag in 7 ml Puffer aufgenommen. Der Puffer bestand aus 20 % Glycerin, 0,5 % Lubrol PX, 10 mM Thioglycerol bzw. 2-ME in 5 mM Tris/Mops-Puffer pH 7,4. Anschließend wurde die Suspension in 0,7 ml Aliquots 15 sec. mit einem Branson-Sonifier (Microtip) auf Stufe 5 mit Ultraschall behandelt und 1 Stunde bei 100 000 g abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand enthielt AC, die sowohl für die weitere Reinigung als auch für Charakterisierungsstudien verwendet wurde.

II.2.5. Gelchromatographie

Verwendet wurden Sephacryl S 200, Sephacryl S 300, Sephacryl S 400 und Ultrogel AcA 22. Für die Läufe wurden 2 hintereinandergeschaltete analytische Säulen der Firma Pharmacia mit einer Länge von je 50 cm und einem Durchmesser von 1 cm benutzt. Das Säulenvolumen betrug pro Säule 35 ml, der Equilibrierungspuffer bestand in der Regel aus 0,1 % Lubrol PX, 20 % Glycerin, 60 mM NaCl, 10 mM 2-ME in 5 mM Tris/HCl pH 7,5. Die Flußgeschwindigkeit betrug 4 ml/h. Das Ausschlußvolumen war 30 ml für Sephacryl S 300 und 22 ml für Ultrogel AcA 22. Aufgetragen wurden 0,9 - 1,5 ml lösliches Enzym mit einer Konzentration von 0,4 - 0,9 mg Protein/ml.

II.2.6. AC-Test

Zur Bestimmung der AC-Aktivität wurde ein Inkubationsvolumen von 100 µl gewählt, das sich wie folgt zusammensetzte:

a) Stabilitätsuntersuchungen/biochemische Charakterisierung

50 mM NaHepes, pH 7,4
2 mM Na-cAMP
0,2 mM bzw. 1 mM Na_2ATP
0,9 mM $MnCl_2$ bzw. 8 mM $MgSO_4$
10 - 30 µg Membranprotein
50 -100 µg Cilienprotein in Anwesenheit von 0,5 mM Squibb 66007

b) Löslichmachen und Reinigung

25 mM Tris/Mops, pH 7,65
2 mM Tris-cAMP
0,2 mM TrisATP
0,9 mM $MnCl_2$
20 - 30 % Glycerin

c) Untersuchungen mit Mg^{2+}, Ca^{2+} und K^+

25 mM Tris/Mops, pH 7,65
2 mM Tris-cAMP
30 % Glycerin
5 - 10 µg lösliches Enzym
Angaben zur Konzentration von TrisATP und $MgSO_4$ siehe Ergebnisse

in allen Fällen: 5 nCi ^{3}H-cAMP
0,5 µCi α-^{32}P-ATP

Die Inkubationstemperatur betrug 37°C, die Inkubationsdauer 8 min. Mit einem regenerierenden System bestehend aus 3,6 U KK und 2,8 mM KP wurde nur in Cilien gearbeitet. Bei den Ergebnissen wird darauf gesondert hingewiesen.

II.2.7. Methoden zur ^{32}P-cAMP Bestimmung

a) Methode nach Gerzer et al. (33)

Hierbei wurde die Reaktion mit 500 µl 120 mM Zinkacetat und 600 µl 144 mM Na_2CO_3 gestoppt. Das auf diese Weise entstandene Zinkcarbonat wurde 6 min bei 1500 g abzentrifugiert und 1 ml des Überstandes auf Säulen aufgetragen, die 0,6 g neutrales Al_2O_3 enthielten. Diese wurden vorher mit Hilfe von 10 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 equilibriert. Eluiert wurde das cAMP mit 4 ml des gleichen Puffers. Die Ausbeutebestimmung erfolgte mittels ^{3}H-cAMP nach Zugabe von 12 ml Bray-Lösung mit Hilfe der Flüssigkeitsscintillationszählung. Bray-Lösung bestand aus 7,6 g 2,5 Diphenyloxazol, 120 g Naphthalin, 40 ml Ethylenglykol und 200 ml Methanol in 1760 ml Dioxan.

b) Methode nach Salomon et al. (34)

Die Inkubation wurde durch Zugabe einer Lösung bestehend aus 1,5 % SDS, 2,8 mM Na_2ATP und 2,8 mM cAMP pH 7,5 auf Eis gestoppt und anschließend mit 0,8 ml H_2O dest. verdünnt. Die gesamte Probe wurde auf eine Säule mit einer Länge von 15 cm und einem Durchmesser von 0,4 cm gegeben, die 1 ml Dowex 50 WX 4 enthielt. Anschließend wurde mit 3 ml Wasser gewaschen und mit 4 ml Wasser auf wie unter a) beschriebene Al_2O_3-Säulen eluiert. cAMP wurde von den Al_2O_3-Säulen mit 4ml Tris/HCl (0,1 M, pH 7,5) eluiert. Das Eluat wurde entweder mit 12 ml Bray-Lösung oder mit 4 ml Unisolve I der Firma Zinser zur Flüssigkeitsscintillationszählung versetzt.
Die Dowex-Säulen wurden mit 2 ml 0,2 N HCl regeneriert und vor Benutzung mit 10 ml H_2O dest. gewaschen. Die Al_2O_3-Säulen wurden wie unter a) beschrieben equilibriert.

II.2.8. Berechnung des gebildeten cAMP's

Die Berechnung des während der Inkubation gebildeten cAMP's erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\left(\frac{(^{32}P\ cpm - {}^{32}P\ Blank) \times (^{3}H\ Standard - {}^{3}H\ Blank)}{^{3}H\ cpm} \times cAMP\ (pmol)\right)}{^{32}P\ Standard \times Inkubationszeit\ (min) \times Protein\ (mg)}$$

Bei allen Bestimmungen handelt es sich um Doppelbestimmungen.

II.2.9. Dünnschichtchromatographie

Als Trägermaterial wurden mit Polyethylenimin beschichtete Cellulose F Platten benutzt, auf die jeweils 3 µl 50 mM wässrige Adenosin, ADP, ATP, AMP und cAMP Lösungen als Referenzsubstanzen aufgetragen wurden. Als Laufmittel wurde 0,5 M LiCl benutzt, die Laufstrecke betrug 15 cm und die Laufzeit 1 Stunde. Die Detektion der Referenzsubstanzen erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe (33).

II.2.10. Autoradiographie

Zur Detektion der mit ^{32}P-markierten Substanzen wurde die DC-Platte in einer lichtdicht verschließbaren Kasette mit einem Röntgenfilm in Kontakt gebracht und für 4 Tage bei -80°C gelagert. Die Röntgenfilme wurden 5 min in einer Entwicklerlösung entwickelt, zum Stoppen 30 sec in 2 %-igen Eisessig getaucht, 30 min in H_2O dest. gewässert, 10 min in einem Fixierbad fixiert, nochmals 30 min gewässert und dann mit H_2O dest. gespült.

II.2.11. Proteinbestimmung nach Lowry (36)

Die Proteinbestimmung für Cilien und Cilienmembranvesikel erfolgte nach der Methode von Lowry mit BSA in einer Konzentration von 1 mg/ml als Standard. Zu 100 Teilen einer Lösung bestehend aus 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH wurde 1 Teil 1 %-ige $CuSO_4$-Lösung gegeben. Von dieser Lösung wurden 5 ml zu jeder Proteinprobe gegeben, die zuvor mit H_2O bidest. auf 100 µl aufgefüllt worden war. Nach 10 min erfolgte eine Zugabe von 500 µl Folinlösung (1 Teil Folin + 1 Teil H_2O bidest.). Es wurde sofort kräftig gemischt. Die Extinktion wurde nach 30 min bei 720 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte über die BSA-Eichgerade mit Hilfe eines linearen Regressionsprogramms.

II.2.12. Lowry im Halbmikromaßstab

Diese Methode wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach den Gelchromatographieläufen benutzt. Sie ist brauchbar für Proteinkonzentrationen zwischen 2 und 20 µg (84). Protein wurde dazu mit 10 %-iger TCA-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Mischung wurde 2 Stunden auf Eis stehen gelassen. Danach wurde der Niederschlag 2 min in einer Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert, in 170 µl H_2O bidest., 30 µl 10% SDS, 180 µl Lösung I (2g K-Na-Tartrat + 100 g Na_2CO_3 in 1 L 0,5 N NaOH) und 20 µl Lösung II (2 g K-Na-Tartrat + 1 g $CuSO_4$ in 100 ml 0,1 N NaOH) resuspendiert und 10 min bei 50°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte unter Mischen die Zugabe von 600 µl Folinlösung (1 Teil Folin-Reagenz + 15 Teile H_2O bidest.). Nach nochmaliger Inkubation bei 50°C für 10 min und Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 650 nm. Für die Eichgerade wurde BSA mit Hilfe des entsprechenden Säulenpuffers auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml eingestellt. Für jeden Punkt der Eichgerade wurde ebenfalls die TCA-Fällung durchgeführt.

II.2.13. Berechnung der MgATP-Konzentration und der freien Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Konzentration

Grundlage für die Berechnung der Konzentration von MgATP, Mg^{2+} und Ca^{2+} in Anwesenheit von 10 µM EGTA bei pH 7,65 war ein Programm von Fabiato u. Fabiato zur Errechnung der Zusammensetzung von Lösungen, die verschiedene Metalle und Liganden enthalten (68). Normalerweise werden die Stabilitätskonstanten von Metall-Ligand-Komplexen als absolute Stabilitätskonstanten angegeben. Ausgehend von diesen absoluten Stabilitätskonstanten wurde mit Hilfe dieses Programms die scheinbare Stabilitätskonstante bei dem entsprechenden pH-Wert und die endgültige Zusammensetzung der Lösung bezüglich der Konzentration von Metall-Ligand-Komplex und freiem Ligand errechnet.

III. ERGEBNISSE

III.1. cAMP-Bestimmung

a) Methode nach Gerzer et al.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde cAMP von dem Inkubationsansatz nach der Methode von Gerzer et al. abgetrennt. Unter Standardinkubationsbedingungen lag der Blindwert einer neuen ^{32}P-ATP-Charge zwischen 300 und 2000 cpm und stieg in Abhängigkeit von der Lagerungszeit auf über das 10-fache. Unter diesen Bedingungen war eine sinnvolle ^{32}P-cAMP Bestimmung nicht mehr möglich. Die daraufhin angefertigten Dünnschichtchromatographien und Autoradiogramme des eingesetzten ^{32}P-ATP's und des Blindwertes zeigten bei ^{32}P-ATP zwei weitere Schwärzungen und für den Blindwert ebenfalls eine Schwärzung, die mit keiner Referenzsubstanz zu korrelieren war. Zugabe von Schweinehirn-PDE, die mit Calmodulin und 0,5 mM Ca^{2+} optimal aktiviert war, führte zu keiner Veränderung des Blindwertes. Es scheint sich hier um ein unspezifisches Zersetzungsprodukt zu handeln, das während der Lagerung entsteht und durch diese Methode von cAMP nicht mehr abzutrennen ist.

b) Methode nach Salomon et al.

Wegen der oben beschriebenen Schwierigkeiten wurde die Methode nach Salomon et al. etabliert, bei der der Blindwert um das 10-fache unter dem von der Methode nach Gerzer et al. liegen sollte (34). Das Elutionsprofil, das man nach Auftrag von ^{3}H-cAMP mit H_2O dest. als Elutionsmittel erhielt, ist in Abb. 1 dargestellt. Der Hauptanteil des ^{3}H-cAMP's erscheint zwischen dem 4. und 8. ml H_2O. Aus diesem Grunde wurden die ersten 3 ml H_2O verworfen und mit den folgenden 4 ml H_2O das cAMP auf die Al_2O_3-Säulen eluiert, von denen dann das cAMP mit Hilfe von 4 ml Tris/HCl pH 7,5 heruntergeholt wurde. Die Ausbeute betrug bei diesem Test 70 - 90 % je nach Säule.

Wegen dieser unspezifischen Adsorption der Säulen war eine Ausbeutebestimmung mit Hilfe von ^{3}H-cAMP für jede Säule unerläßlich. Der Blindwert lag bei diesem Test zwischen 10 und 50 cpm.

c) Identifizierung des Reaktionsproduktes mittels Autoradiographie

Die R_f-Werte, die man für ATP, ADP, AMP, Adenosin, Adenin und cAMP mit 0,5 M LiCl als Fließmittel erhielt, sind der Tabelle 1 zu entnehmen. cAMP hat dabei einen R_f-Wert von 0,6. Auf der gleichen Höhe findet man eine Schwärzung des Autoradiogramms, wenn man 10 µl des Al_2O_3-Eluates auf das DC aufträgt.

Tabelle 1. R_f-Werte nach Dünnschichtchromatographie

	R_f-Werte		R_f-Werte
ATP	0,87	Adenosin	0,4
ADP	0,79	Adenin	0,25
AMP	0,5	cAMP	0,6

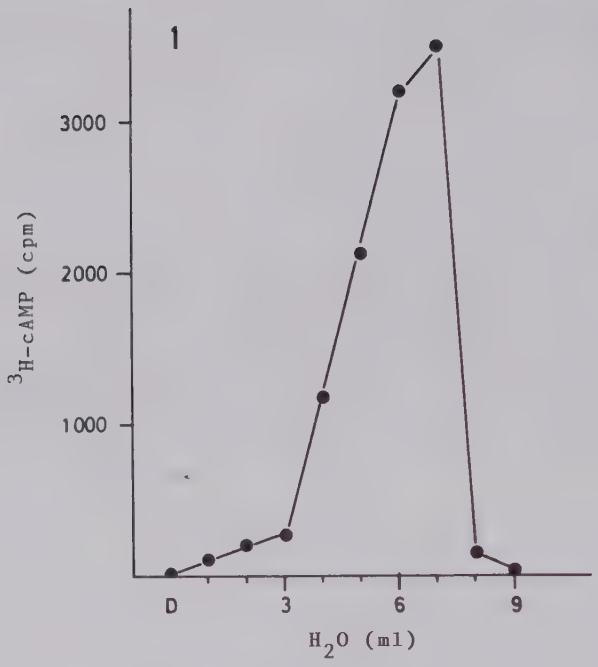


Abb. 1. Elutionsprofil von ^{3}H-cAMP
1 ml ^{3}H-cAMP (12000 cpm) wurde auf 1 ml Dowex WX4 aufgetragen und mit 8 ml H_2O dest. eluiert. Das Säuleneluat wurde 1 ml-weise fraktioniert, mit 10 ml Bray-Lösung versetzt und im β-Counter 4 min gezählt.
D = Durchlauf nach Auftrag

III.2. STABILITÄT

Versuche zum Einfluß der Vorinkubation auf die AC zeigten eine deutliche Aktivitätsabnahme auf bis zu 10 %, wenn Cilienmembranvesikel in 10 mM NaHepes pH 7,4 einer Temperatur von 37°C über einen Zeitraum von 20 min ausgesetzt wurden (Abb. 3b, 3d).
Auf Grund dieser Ergebnisse war es wichtig zu überprüfen, ob das Enzym auch unter Bedingungen instabil ist, wie sie während der Hauptinkubation vorliegen. Bezugswert mit 100 % ist in allen Fällen die AC-Aktivität, die man erhielt, wenn bei -80°C gelagerte Cilienmembranvesikel frisch aufgetaut und sofort getestet wurden.

III.2.1. Vorinkubation verschiedener Vesikelchargen

Es wurden 4 verschiedene Chargen von Cilienmembranvesikeln in 10 mM NaHepes pH 7,4 bei 37°C vorinkubiert. Die anschließende Hauptinkubation erfolgte mit MnATP (0.9 mM $MnCl_2$, 0,2 mM Na_2ATP) oder mit MgATP (8 mM $MgCl_2$, 0,2 mM Na_2ATP) wie in Kap. II.2.6. beschrieben. Die Ergebnisse sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2. Abnahme der AC-Aktivität nach Vorinkubation bei 37°C in Abhängigkeit von der Vesikelcharge

	50 % Aktivitätsverlust nach	
Vesikelcharge	A	B
1	10 min	5 min
2	17 min	17 min
3	7 min	9 min
4	12 min	12 min

A = Hauptinkubation mit 0,9 mM $MnCl_2$ und 0,2 mM Na_2ATP
B = Hauptinkubation mit 8 mM $MgCl_2$ und 0,2 mM Na_2ATP

III.2.2. Anwesenheit eines Kofaktors während der Vorinkubation

Anwesenheit von 1,8 mM $MnCl_2$ oder 11,14 mM $MgCl_2$ führte zu keiner Veränderung der Inaktivierung während der Vorinkubation im Vergleich zu III.2.1.

III.2.3. Einfluß des pH-Wertes

Vorinkubation mit 10 mM NaHepes pH 8,4 führte zu dem gleichen Ergebnis wie Vorinkubation mit 10 mM NaHepes pH 7,4.

III.2.4. Vorinkubation in Anwesenheit von cAMP, EGTA, Na_2ATP, NaHepes und $MnCl_2$ bzw. $MgCl_2$

Inkubiert man Cilienmembranvesikel unter Bedingungen, unter denen die AC aktiv ist, so findet man eine Aktivitätsabnahme, die mit der eingangs beschriebenen durchaus vergleichbar ist. Die Ergebnisse sind Abb. 2 zu entnehmen. Sie machen klar, daß das Enzym im aktiven Zustand nicht stabil sein kann.

III.2.5. Einfluß der Temperatur

Es galt zu klären, ob die Inkubationstemperatur verantwortlich für die Aktivitätsabnahme ist. Hierzu wurden Cilienmembranvesikel in Anwesenheit von 10 mM NaHepes pH 7,4 bei Temperaturen zwischen 0°C und 37°C über einen Zeitraum von 20 min hinweg untersucht. Die hier untersuchten Vesikelchargen waren alle bei 0°C über diesen Zeitraum hin stabil. Eine Charge zeigte auch bei 30°C keinen Aktivitätsverlust nach 20 min, jedoch 50 % Verlust nach dieser Zeit bei einer Inkubationstemperatur von 32,5°C. Bei 35°C wurde dieser Aktivitätsverlust schon nach 10 min und bei 37°C nach 7 min erreicht (Abb. 3a, 3b).
Bei einer anderen Charge betrug der Aktivitätsverlust bei 30°C nach 10 min 50 % (Abb. 3c, 3d). Diese Tatsache zeigte

deutlich, daß auch bei einer niedrigeren Inkubationstemperatur die Stabilität des Enzyms nicht gewährleistet ist.

III.2.6. Einfluß von BSA und Proteasehemmern

Es wurde überprüft, ob die Instabilität des Enzyms auf einen proteolytischen Abbau zurückzuführen ist. Dazu wurden 0,9 ml Membranvesikel (1,35 mg Protein) mit und ohne 9 mg BSA bis zu 30 min bei 37°C vorinkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurden pro Test 20 µl dieses Ansatzes entnommen und mit MgATP (8 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP) wie in Kap. II.2.6. beschrieben bei 37°C 8 min inkubiert. Der Bezugswert von frisch aufgetauten Vesikeln hatte eine spezifische Aktivität von 320 pmol x min^{-1} x mg^{-1} ohne BSA und mit BSA 75 pmol x min^{-1} x mg^{-1}. Nach 18 min Vorinkubation mit BSA betrug der Aktivitätsverlust 50 %. Ohne BSA wurde ein Absinken der Aktivität auf 50 % nach 20 min Vorinkubation beobachtet. Ebenso vermochte der Zusatz von 750 µl eines Protease-Hemmcocktails zu 500 µl Vesikeln (750 µg Protein) die Inaktivierung der AC während der Vorinkubation nicht aufzuhalten. Der Protease-Hemmcocktail bestand aus 300 µg TLCK, 60 µg Leupeptin, 137 µg Pepstatin, 100 µg Aprotinin und 100 µM PMSF in 10 ml 10 mM NaHepes pH 7,4. Zur Hauptinkubation wurden pro Test 50 µl dieses Ansatzes entnommen und mit 8 mM $MgCl_2$ und 1 mM Na_2ATP wie Kap. II.2.6. beschrieben inkubiert. Der Bezugswert mit 100 % AC-Aktivität hatte mit und ohne Proteasehemmcocktail eine spezifische Aktivität von 343 pmol x min^{-1} x mg^{-1}. Mit Proteasehemmcocktail wurde nach 17 min Vorinkubation ein Aktivitätsverlust von 50 % gefunden. Ohne Proteasehemmcocktail wurde dieser Wert nach 20 min Vorinkubation erreicht.
Diese Ergebnisse lieferten keinen Anhaltspunkt für eine durch Proteolyse bedingte Abnahme der AC-Aktivität.

III.2.7. Einfluß von Sucrose

Erfolge bei der Stabilisierung des Enzyms wurden mit Sucrose erzielt. Die Stabilisierung war dabei von der Sucrosekonzentration abhängig. Es wurden Cilienmembranvesikel mit verschiedenen Sucrosekonzentrationen über einen Zeitraum von 20 min bei 37°C vorinkubiert. Die Ergebnisse sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3. Einfluß von Sucrose auf die Aktivitätsabnahme

Sucrosekonzentration während der Vorinkubation	% Aktivitätsverlust	nach
0	70 %	20 min
50 mM	50 %	20 min
250 mM	40 %	21 min
500 mM	27 %	20 min

500 µl Membranvesikel (750 µg Protein) wurden mit 250 µl 10 mM NaHepes pH 7,4 bzw mit 250 µl einer 150 mM, einer 750 mM und einer 1,5 M Sucroselösung bei 37°C vorinkubiert. Zur Hauptinkubation wurden nach verschiedenen Zeiten 30 µl von dem Vorinkubationsansatz entnommen. Die Hauptinkubation erfolgte mit 8 mM $MgCl_2$ und 0,2 mM Na_2ATP wie in Kap. II.2.6. beschrieben.

III.2.8. Einfluß von Glycerin und DMSO

Als bester Stabilisator für die AC hat sich bislang Glycerin erwiesen. Anwesenheit von 33 % Glycerin während der Vorinkubation bei 37°C führte mit MnATP als Substrat (0,9 mM $MnCl_2$, 0,2 mM Na_2ATP) zu keinem Aktivitätsverlust innerhalb von 30 min. Mit MgATP als Substrat kam es zu einer leichten Aktivierung der AC auf 130 - 140 % des Ausgangswertes. Auch DMSO hatte in einer Konzentration von 30 % einen aktivierenden Einfluß, wenn MgATP als Substrat diente. Hier wurde jedoch nach 5 min Vorinkubation bei 37°C ein Maximum erreicht. Nach 30 min wurden noch 90 % der Ausgangsaktivität gefunden, Mit MnATP als Substrat wurde keine Aktivierung und eine schlechtere Stabilisierung im Vergleich zu Glycerin beobachtet. Nach 30 min betrug die AC-Aktivität nur noch 60 % der Ausgangsaktivität im Vergleich zu 110 % mit Glycerin und 26 % ohne jeden Zusatz (Abb. 4a, 4b).

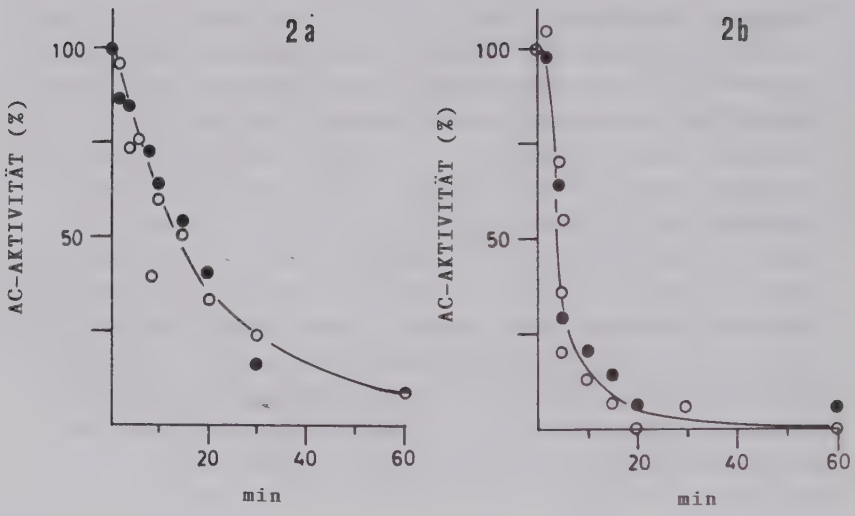


Abb. 2. Vorinkubation von Vesikeln in An- und Abwesenheit von Na_2ATP

500 µl Vesikel (750 µg Protein) wurden in 1,75 ml einer Lösung bestehend aus 2,86 mM cAMP, 7,14 mM NaHepes pH 7,4, 140 M EGTA, 1,29 mM $MnCl_2$ (Abb. 2a) bzw. 11,14 mM $MgCl_2$ (Abb. 2b) mit ( )und ohne ( ) 140 µM Na_2ATP bei 37°C bis zu 60 min vorinkubiert (Gesamtvolumen 2,25 ml). Die Hauptinkubation wurde nach Entnahme von 70 µl (= 30 µg Protein) des Vorinkubationsansatzes durch Zugabe von 30 µl einer Lösung bestehend aus 0,66 mM Na_2ATP, 0,5 µCi ^{32}P- ATP und 5 nCi ^{3}H-cAMP gestartet. Bezugswerte entsprechend 100 % AC-Aktivität betragen für

Abb. 2a (●) = 537 pmol x min^{-1} x mg^{-1}
Abb. 2a (○) = 704 pmol x min^{-1} x mg^{-1}
Abb. 2b (●) = 221 pmol x min^{-1} x mg^{-1}
Abb. 2b (○) = 206 pmol x min^{-1} x mg^{-1}

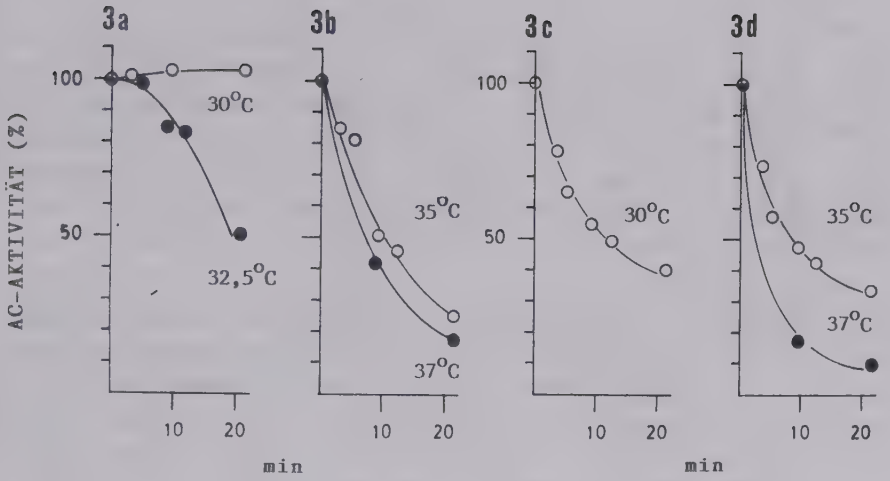


Abb. 3. Vorinkubation bei verschiedenen Temperaturen
500 µl Membranvesikel von 2 verschiedenen Präparationen wurden in 2,5 mM NaHepes pH 7,4 über einen Zeitraum von 20 min bei verschiedenen Temperaturen vorinkubiert. Die anschließende Hauptinkubation erfolgte nach Entnahme von 20 µl/Test mit 8 mM $MgCl_2$ und 1 mM Na_2ATP bei 37°C wie in Kap. II.2.6. beschrieben.

3a + 3b: Vesikelcharge 1 (Proteinkonzentration 1,5 µg/µl)
100 % AC-Aktivität = 500 pmol x min^{-1} x mg^{-1}

3c + 3d: Vesikelcharge 2 (Proteinkonzentration 1,2 µg/µl)
100 % AC-Aktivität = 440 pmol x min^{-1} x mg^{-1}

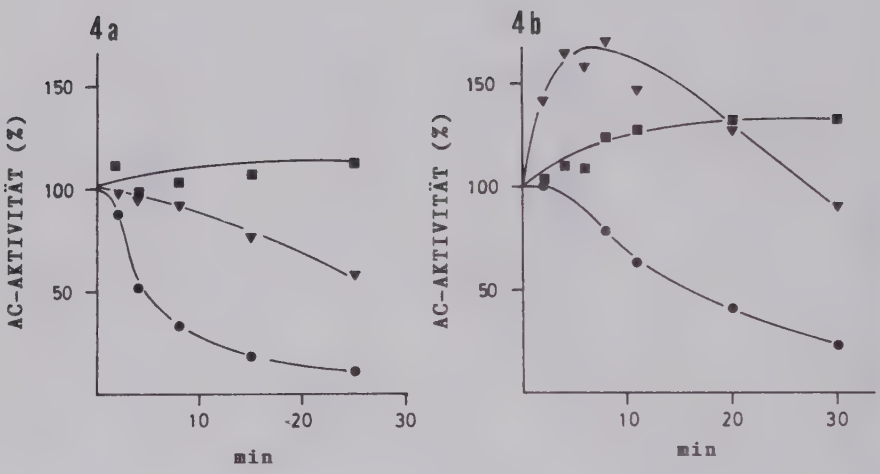


Abb. 4. Vorinkubation mit 30 % Glycerin oder 30 % DMSO
500 µl Vesikel wurden mit 250 µl Glycerin (99 %) (■),
mit 250 µl DMSO (99%) (▼) und mit 250 µl 10 mM NaHepes
pH 7,4 (●) bis zu 30 min bei 37°C vorinkubiert. Zur Haupt-
inkubation wurden nach verschiedenen Zeiten 30 µl/Test
(31 µg Protein) entnommen. Bezugswert mit 100 % AC-Aktivität
ist die AC-Aktivität von frisch aufgetauten Vesikeln unter
den entsprechenden Bedingungen.

4a: Anschließende Hauptinkubation mit 0,9 mM $MnCl_2$ und
0,2 mM Na_2ATP wie in Kap. II.2.6. beschrieben.

100 % AC-Aktivität = 927 pmol x min^{-1} x mg^{-1} (■)
859 pmol x min^{-1} x mg^{-1} (▼)
766 pmol x min^{-1} x mg^{-1} (●)

4b: Anschließende Hauptinkubation mit 8 mM $MgCl_2$ und
0,2 mM Na_2ATP wie Kap. II.2.6. beschrieben.

100 % AC-Aktivität = 145 pmol x min^{-1} x mg^{-1} (■)
133 pmol x min^{-1} x mg^{-1} (▼)
83 pmol x min^{-1} x mg^{-1} (●)

III.3. GLYCERINAKTIVIERUNG

III.3.1. Einfluß von Glycerin und DMSO auf die Aktivität des Enzyms

Der unterschiedliche Einfluß von Glycerin und DMSO auf die Aktivierung der AC wurde genauer untersucht. Hierzu wurden Glycerin und DMSO-Dosiswirkungskurven angefertigt, wobei sowohl MnATP (0,9 mM $MnCl_2$, 0,2 mM Na_2ATP) als auch MgATP (8 mM $MgCl_2$, 0,2 mM Na_2ATP) als Substrat eingesetzt wurde. Dabei aktivierte Glycerin die AC unabhängig von dem verwendeten Substrat. Unterschiede bestanden jedoch in der Höhe der Aktivierung:
Mit MgATP wurde mit 40 % Glycerin das 18-fache der Ausgangsaktvität gefunden. Mit MnATP betrug dieser Wert nur das 3-fache der Aktivität ohne Glycerin (Abb. 5). Die bei diesen Versuchen erhaltenen spezifischen Aktivitäten sind Tabelle 4 zu entnehmen und zeigen, daß mit 40 % Glycerin und mit MgATP als Substrat eine spezifische Aktivität erreicht wurde, die in der Größenordnung der spezifischen Aktivität lag, die man unter gleichen Bedingungen mit MnATP als Substrat erhielt.
Für DMSO war der Kurvenverlauf biphasisch:
Mit MgATP als Substrat wurde mit 35 % DMSO ein Maximum erreicht, das das 15-fache der AC-Aktivität ohne DMSO betrug. Mit MnATP wurde ein Maximum schon bei einer DMSO-Konzentration von nur 20 % erreicht. Die Aktivierung in Gegenwart von MnATP auf das 1,6-fache der Ausgangsaktivität lag jedoch deutlich unter derjenigen, die man mit MgATP erreichte. (Abb. 6)
Diese Untersuchungen wurden mit Cilienmembranvesikel gemacht. Wegen des positiven Effektes von Glycerin auf die Stabilität des Enzyms und dem günstigen Einfluß auf die Aktivität mit MgATP als Substrat wurden im folgenden alle weiteren Untersuchungen in Gegenwart von 20 oder 30 % Glycerin angefertigt. Dabei wurde ständig überprüft, ob die so erhaltenen Ergebnisse mit der Anwesenheit von Glycerin

zusammenhängen oder auch ohne Glycerin als Stabilisator erreicht werden. Bei den einzelnen Untersuchungen wird darauf gesondert hingewiesen.

Tabelle 4. Spezifische Aktivitäten der AC mit MnATP und MgATP als Substrat

Glycerin	Substrat: MgATP	MnATP
	c-AMP (pmol x min^{-1} x mg^{-1})	
0	111	841
10 %	156	1779
20 %	250	1812
30 %	1066	2079
40 %	1991	2433

20 µl Cilienmembranvesikel (30 µg Protein)/Test wurden mit 0,9 mM $MnCl_2$ bzw. 8 mM $MgCl_2$ und 0,2 mM Na_2ATP wie in Kap. II.2.6. beschrieben mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen 8 min bei 37°C inkubiert.

III.3.2. Vergleichende Untersuchungen zur Glycerinaktivierung in Cilien, Membranvesikeln und löslichem Enzym

Bei diesen Versuchen wurde ein Teil einer Cilienpräparation zu Vesikeln verarbeitet, von denen wiederum ein Teil zur Herstellung des gelösten Enzyms verwendet wurde. In den anschließenden Inkubationen betrug die $MgCl_2$-Konzentration 8 mM, die Na_2ATP-Konzentration 1 mM. Unter diesen Bedingungen wurde in Cilien und Vesikeln ein fast identischer Kurvenverlauf der Glycerinaktivierung erhalten (Abb. 7a, 7b). Die Werte, die mit 30 % Glycerin erhalten wurden, lagen hier bei zwei verschiedenen Präparationen zwischen 500 und 600 % über denen ohne Glycerin. Anders war der Kurvenverlauf mit löslichem Enzym. Bei Präparation A war eine Sättigung nur zu erahnen. Mit 40 % Glycerin wurde eine 10-fache Aktivierung erreicht. Präparation B zeigte hingegen den gleichen Kurven-

verlauf, der mit den entsprechenden Cilien und Membranvesikeln erreicht wurde (Abb. 7c).
Wichtig ist, daß die Aktivierung der AC durch Herauslösen aus der Cilienmembran nicht verloren geht und auch nicht unter den Werten liegt, die mit Cilien und Vesikeln erreicht werden. Diese Tatsache schließt einen direkten Membraneffekt des Glycerins aus.

III.3.3. Einfluß der ATP Konzentration auf die Glycerinaktivierung

Je niedriger die eingesetzte Substratkonzentration ist, um so größer ist die Aktivierung, die man mit Glycerin erreicht. Die Ergebnisse, die man mit löslichem Enzym mit und ohne 30 % Glycerin und einer konstant gehaltenen freien Mg^{2+}-Konzentration von 1,02 mM erhielt, sind in Tabelle 5 aufgeführt. Der K_m^a-Wert betrug ohne Glycerin 5 mM und mit Glycerin 0,77 mM.

Tabelle 5. Einfluß der ATP-Konzentration auf die Glycerinaktivierung der AC

TrisATP	ohne Glycerin	mit Glycerin	Aktivierung
(mM)	(pmol/8 min)	(pmol/8 min)	(%)
0,2	3,8	63	1670
0,4	8,4	120	1420
0,6	11,5	160	1390
1,0	14,0	155	1107
2,0	29,0	232	800

10 µl (8 µg Protein) lösliches Enzym wurden in An- und Abwesenheit von 30 % Glycerin bei verschiedenen Konzentrationen TrisATP wie in Kap. II.2.6 beschrieben inkubiert. Die $MgSO_4$-Konzentration wurde so gewählt, daß bei jeder getesteten Substratkonzentration die freie Mg^{2+}-Konzentration 1,02 mM betrug.

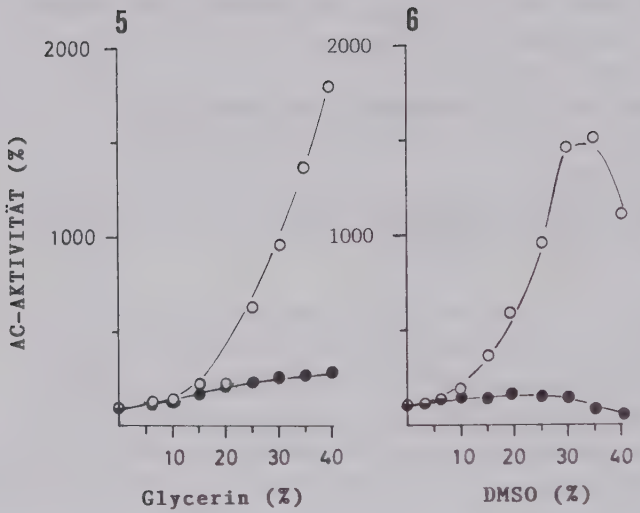


Abb. 5. Glycerineinfluß auf die AC-Aktivität

Abb. 6. DMSO-Einfluß auf die AC-Aktivität

(○) = Inkubation in Anwesenheit von 8 mM $MgCl_2$ und 0,2 mM Na_2ATP

(●) = Inkubation in Anwesenheit von 0,9 mM $MnCl_2$ und 0,2 mM Na_2ATP

Die Inkubationen wurden mit 20 µl Vesikelprotein (30 µg) /Test wie in Kap.II.2.6. beschrieben durchgeführt.

100 % AC-Aktivität entspricht der AC-Aktivität ohne Glycerin und DMSO-Zusatz mit einer spezifischen Aktivität von

112 pmol x min^{-1} x mg^{-1} (MgATP) bzw.

840 pmol x min^{-1} x mg^{-1} (MnATP).

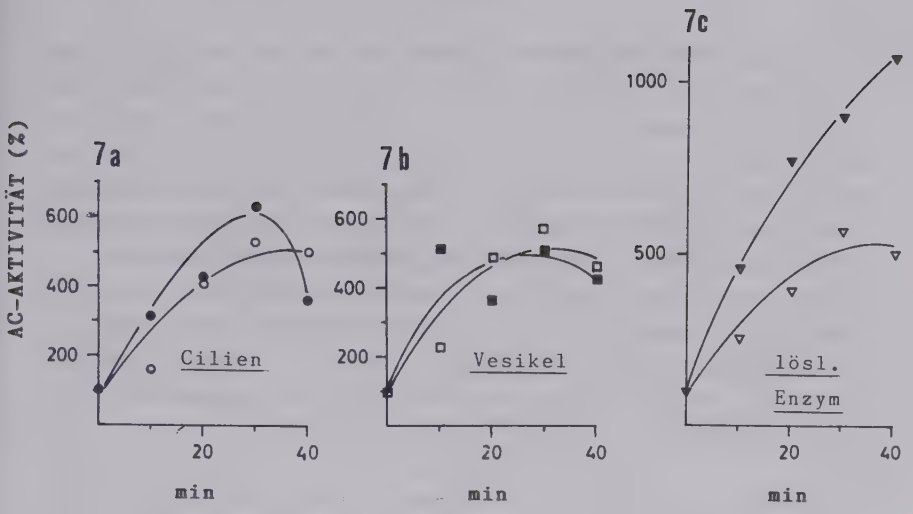


Abb. 7. Glycerin-Dosiswirkungskurven in Cilien, Cilienmembranvesikel und löslichem Enzym

Alle Inkubationen wurden mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM Na_2ATP durchgeführt wie in Kap. II.2.6.beschrieben. Die Ergebnisse von 2 verschiedenen Präparationen (A = geschlossene, B = offene Symbole) sind wiedergegeben. 100 % AC-Aktivität entspricht der AC-Aktivität ohne Glycerinzusatz. Die entsprechenden spezifischen Aktivitäten betragen für:

7a: (●) = 84 pmol x min^{-1} x mg^{-1}
(○) = 157 pmol x min^{-1} x mg^{-1}

7b: (■) = 255 pmol x min^{-1} x mg^{-1}
(□) = 110 pmol x min^{-1} x mg^{-1}

7c: (▼) = 100 pmol x min^{-1} x mg^{-1}
(▽) = 110 pmol x min^{-1} x mg^{-1}

7a: Inkubation mit 10 µl (22 µg Protein) Cilien der Präparation A und 10 µl (50 µg Protein) Cilien der Präparation B.

7b: Inkubation mit 10 µl Cilienmembranvesikel (12 µg) der Präparation A und 10 µl Cilienmembranvesikel (15 µg) der Präparation B.

7c: Inkubation mit 10 µl löslichem Enzym (5 µg) der Präparation A und 10 µl löslichem Enzym (5 µg) der Präparation B.

III.4. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

III.4.1. Proteinabhängigkeit

Die Linearität der cAMP-Bildung ist in Cilien bis zu einer Konzentration von 140 µg, in Cilienmembranvesikeln bis 30 µg und in löslichem Enzym bis 18 µg gewährleistet (Genaue Bedingungen siehe Abb. 8a, b, c). Glycerinanwesenheit (20 %) hatte in Cilienmembranvesikeln eine konstante Aktivierung zur Folge (Abb. 8b).

III.4.2. Zeitabhängigkeit

Mit MnATP als Substrat war die cAMP-Bildung über einen Zeitraum von 10 min linear (37). Für MgATP als Substrat war die Linearität in Cilienmembranvesikeln nur bis zu 2 min gewährleistet (J. E. Schultz, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grunde wurde überprüft, ob die cAMP-Bildung mit MgATP als Substrat in Anwesenheit von 30 % Glycerin während der üblichen Inkubationsdauer von 8 min bei 37°C linear ist. Die Zeitabhängigkeit in Anwesenheit von 30 % Glycerin mit Cilienmembranvesikeln ist in Abb. 9a dargestellt, die Zeitabhängigkeit mit Cilien unter gleichen Bedingungen in Abb. 9b. Die deutlich sichtbare Verzögerunsphase kann auf einen Glycerineinfluß auf die Bindung von Mg^{2+} und MgATP an das Enzym zurückzuführen sein.

III.4.3. Temperaturabhängigkeit

Im Gegensatz zu einer normalen chemischen Reaktion führt eine Erhöhung der Reaktionstemperatur bei enzymatischen Prozessen nicht zu einem ständigen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit. Bei Enzymen tritt in der Regel ein zweiter Prozess ein, der die durch die Arrheniusgleichung beschriebene Temperaturabhängigkeit überlagert. Es handelt sich dabei um eine thermische Inaktivierung, die oft irreversibel ist. Auf diese Weise erhält man ein Temperaturoptimum, das

unter anderem vom pH-Wert, der Ionenstärke, der Substratkonzentration und der Inkubationsdauer abhängig ist, da diese Faktoren die thermische Denaturierung von Proteinen stark beeinflußen. Deutlich werden diese Einflüße, wenn man die Temperaturoptima mit und ohne 30 % Glycerin vergleicht: Mit Glycerin steigt die Reaktionsgeschwindigkeit von 37°C auf 42,5°C um 170 % an. Ohne Glycerin ist kein Anstieg mehr zu sehen, was auf die fehlende Stabilisierung ohne Glycerin zurückzuführen ist (Abb. 10).
Für den Bereich, für den der Prozeß der Denaturierung zu vernachlässigen ist, gilt die Arrheniusgleichung:

$$k = A \times e^{-E_a/RxT}$$

bzw.:

$$\ln k = \ln A - E_a/R \times 1/T$$

A = Geschwindigkeitskonstante für $T \rightarrow \infty$

Unter der Annahme, daß $v = V_{max}$ ist, läßt sich durch Auftragen von ln v gegen 1/T aus der Steigung der erhaltenen Geraden die Aktivierungsenergie E_a berechnen, da dann die Reaktionsgeschwindigkeit v der Geschwindigkeitskonstanten k direkt proportional ist. Es gilt:

$$m = - E_a/R \text{ mit } R = 8{,}276 \text{ J/mol}$$

Mit MnATP (1 mM $MnCl_2$, 0,2 mM Na_2ATP) als Substrat betrug die Aktivierungsenergie E_a 107 kJ/mol (21). Die Aktivierungsenergie, die man mit Cilienmembranvesikeln und MgATP (8 mM $MgSO_4$, 1 mM TrisATP) in An- und Abwesenheit von 30 % Glycerin erhielt, betrug 114 kJ/mol mit $m = - 13{,}75 \times 10^3$ (Abb. 10).
Die Ergbnisse mit Membranvesikeln und löslichem Enzym in Anwesenheit von 30 % Glycerin, 1 mM TrisATP und 1,46 mM $MgSO_4$ bzw. 3,75 mM $MgSO_4$ sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6. Aktivierungsenergie bei verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen für Vesikel und lösliches Enzym

Protein	$MgSO_4$ (mM)	m	E_a (kJ/mol)
lösliches Enzym	1,46	$- 12{,}88 \times 10^3$	107
lösliches Enzym	3,75	$- 13{,}34 \times 10^3$	111
Membranvesikel	1,46	$- 15{,}2 \times 10^3$	125
Membranvesikel	3,75	$- 14{,}95 \times 10^3$	124

Die Inkubationen wurden mit 10 µl Membranvesikeln (15 µg Protein) bzw. 10 µl löslichem Enzym (5 µg Protein) und 1 mM TrisATP in Anwesenheit von 30 % Glycerin durchgeführt.

III.4.4. pH-Abhängigkeit

Für MnATP als Substrat wurde für die ciliäre Paramecium AC ein starker Anstieg der Aktivität in einem Bereich von pH 6 - 8 beschrieben (21). Er blieb erhalten, wenn anstelle von MnATP MgATP als Substrat verwendet wurde. Er wurde durch Anwesenheit von Glycerin nicht beeinflußt, war außer in Vesikeln auch noch in löslichem Enzym zu finden und war unabhängig von der freien Mg^{2+}-Konzentration (Abb. 11a, 11c). Ein Maximum wurde bei pH 8,8 erreicht. Der Versuch bis zu einem pH-Wert von 9,0 wurde nur in Vesikeln durchgeführt (Abb. 11b).

Zu jedem pH-Wert wurde ein Blindwert ohne Enzym gemacht und bei der Berechnung des gebildeten cAMP's berücksichtigt. Auf diese Weise wurde ausgeschlossen, daß der pH-Anstieg eine Folge einer pH-abhängigen unspezifischen Bildung von cAMP ist. Der Effekt war allerdings nur von Bedeutung, wenn der Test mit Zinkacetat und Na_2CO_3 gestoppt wurde, wobei hier wahrscheinlich der Einfluß von zweiwertigen Kationen auf die unspezifische cAMP-Bildung zum Tragen kam (39).

III.4.5. ATPasen und Phosphodiesterasen

Bei der Bildung von cAMP aus ATP durch ungereinigte Adenylatcyclasen in einem Protein/Enzymgemisch müssen zwei weitere enzymatische Prozesse bedacht werden, die direkt oder indirekt einen Einfluß auf die Menge des gebildeten bzw. meßbaren cAMP's haben können:

1) Die Anwesenheit des zur Verfügung stehenden ATP's kann durch die Anwesenheit von ATPasen stark reduziert werden. Dabei muß angemerkt werden, daß maximal 1 % des eingesetzten Substrates umgesetzt wurde. Zugabe eines regenerierenden Systems bestehend aus KK und KP bzw. PEP und PK bewirkt, daß das mit Hilfe von ATPasen gebildete ADP wieder zu ATP umgewandelt wird. Auf diese Weise wird der AC eine konstante Menge Substrat zur Verfügung gestellt, so daß sich die ATPase Wirkung weniger stark auf die Höhe des aus ATP gebildeten cAMP's auswirkt.
In unserem System machte sich die Abnahme des Substrates durch ATPasen nur in Cilien bemerkbar. Anwesenheit von 2,8 mM KP und 3,6 U KK führte hier offensichtlich zu einem höheren ATP-Angebot, was sich in einer höheren Umsatzrate wiederspiegelte. Werte mit diesem regenerienden System lagen um das 1,6-fache über denen, die ohne Anwesenheit eines regenerierenden System's gemessen wurden (Abb. 31).

2) cAMP kann durch Phosphodiesterasen in AMP gespalten werden. Die Wiederfindungsrate des zugesetzten ^{3}H-cAMP's war dabei ein Anhaltspunkt für eine mögliche PDE-Aktivität. Sie lag nach Inkubationen sowohl ohne Protein als auch mit löslichem Enzym und Cilienmembranvesikel zwischen 70 und 90 %, mit Cilien zwischen 20 und 50 %. Anwesenheit von 0,5 mM Squibb 66007 führte auch in Cilien zu einer Wiederfindungsrate von 70 - 90 %, wohingegen 1 mM IBMX, ein gängiger PDE-Hemmstoff zu keiner Erhöhung der ^{3}H-cAMP-Wiederfindungsrate führte. Untersuchungen einer cAMP-abbauenden PDE in Paramecium tetraurelia auf Hemmbarkeit mit verschiedenen PDE-Inhibitoren zeigten, daß Squibb 66007 in einer Konzentration von 0,5 mM diese PDE fast vollständig hemmte (87).

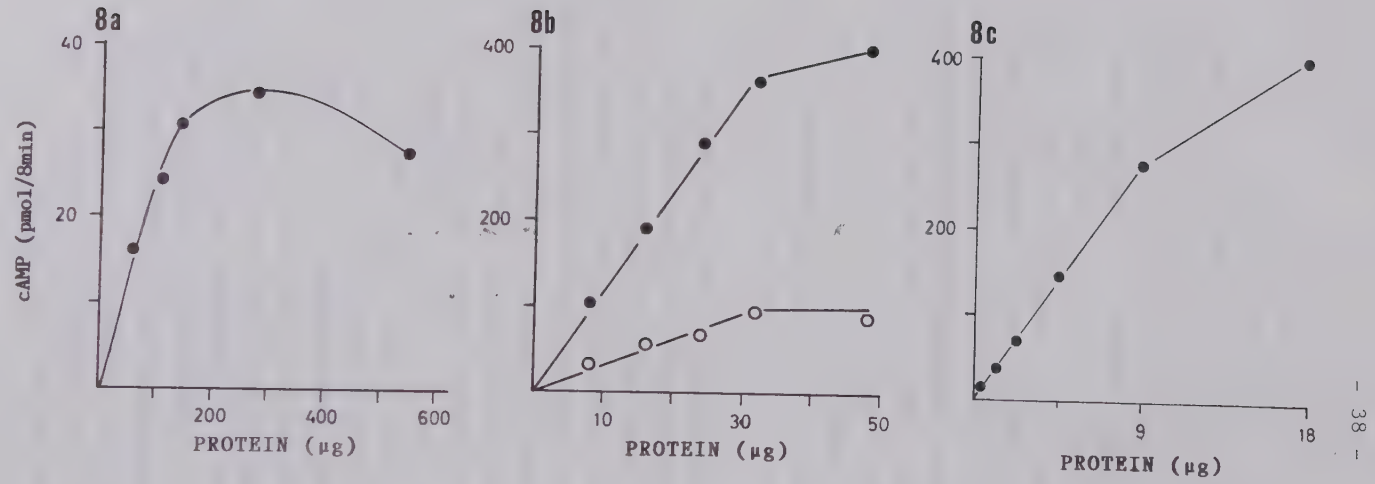


Abb. 8. Proteinabhängigkeit der AC

8a: mit Cilien in Anwesenheit von 30 % GLycerin

8b: mit Cilienmembranvesikel mit (●) und ohne (○) 20 % Glycerin

8c: mit löslichem Enzym in Anwesenheit von 30 % Glycerin

Die Inkubationen 8a und 8b wurden mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP durchgeführt, die von 8c mit 0,9 mM $MnCl_2$ und 0,2 mM TrisATP.

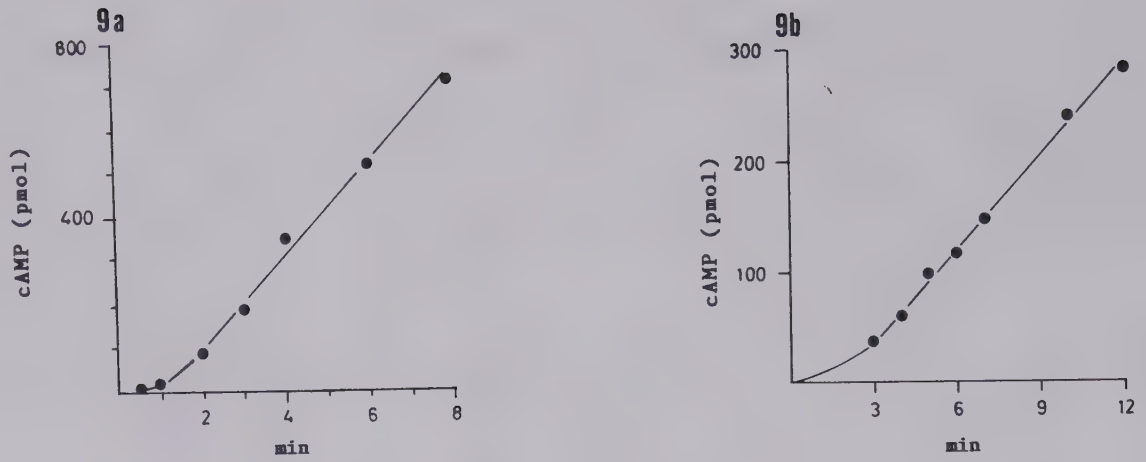


Abb. 9. Zeitabhängigkeit der AC
9a: Zeitabhängigkeit mit Vesikeln (25 µg Protein/Test)
9b: Zeitabhängigkeit mit Cilien (50 µg Protein /Test)

Diese Inkubationen wurden mit 30 % Glycerin mit 8mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt.

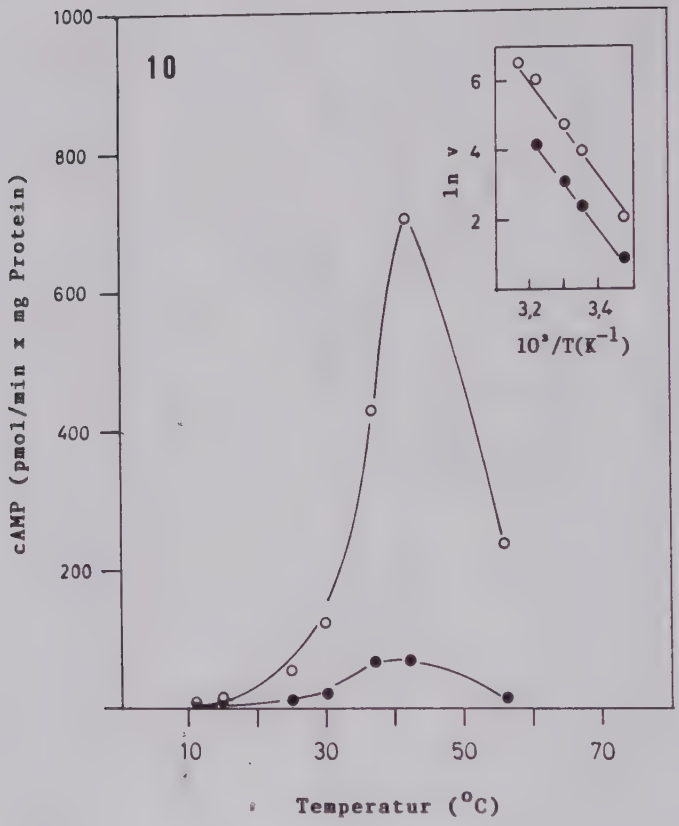


Abb. 10. Temperaturabhängigkeit der AC
Temperaturabhängigkeit der AC mit Cilienmembranvesikeln (25 µg Protein/Test) mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP in An- (o) und Abwesenheit (●) von 30 % Glycerin. Insert: dazugehörige Arrheniusdarstellung

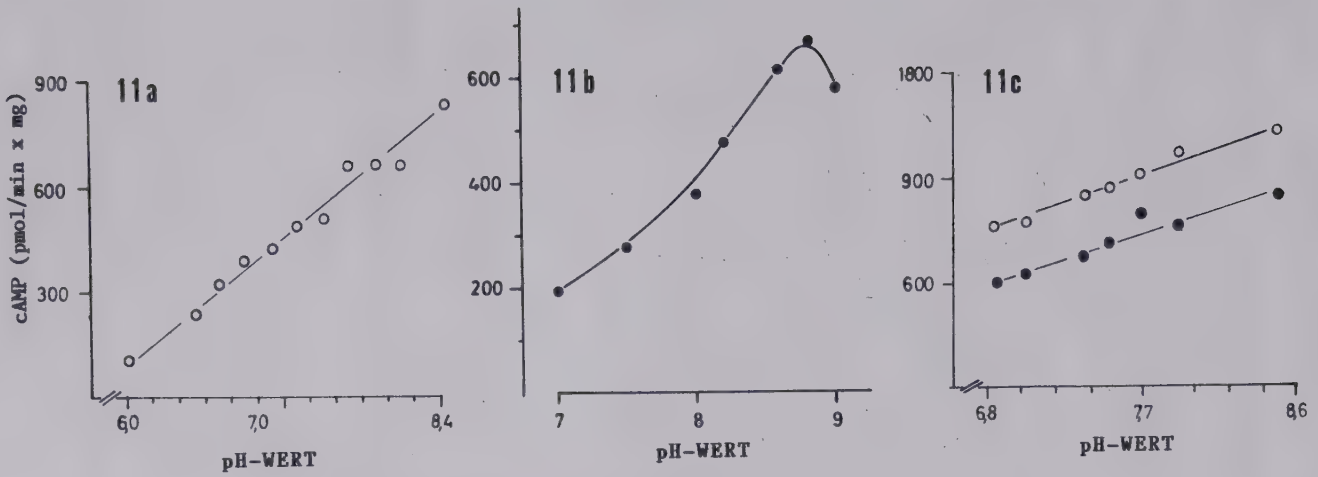


Abb. 11. pH-Abhängigkeit der AC

11a: pH-Abhängigkeit der AC in Cilienmembranvesikeln (30 µg Protein/Test) mit 20 % Glycerin, 8 mM $MgSO_4$, 1 mM TrisATP und Tris/Mops-Puffern

11b: wie unter a) beschrieben ohne Glycerin und mit Tris/HCl-Puffern

11c: mit löslichem Enzym (5 µg Protein/Test) mit 1,46 mM (●) und 3,75 mM $MgSO_4$ (○), 1 mM TrisATP, 30 % Glycerin und Tris/Mops-Puffern.

Die pH-Werte wurden mit 500 mM Tris und 500 mM Mops bzw. 6 N HCl bei 37°C eingestellt.

Die Puffer wurden im Inkubationsansatz 1:10 verdünnt.

III.5. LÖSLICHMACHEN DER AC UND WEITERE REINIGUNG

III.5.1. Chymotrypsinbehandlung

Für membrangebundene ACen aus Spermien von Widder und Bullen und cyc^--Lymphomazellen wurde beschrieben, daß sie nach Andauen der Membran mit Chymotrypsin aus der Membran herausgelöst wurden (40).
Um zu überprüfen, ob die AC aus der Cilienmembran auch auf diese Weise zu entfernen ist, wurden 500 µl Membranvesikel wahlweise mit einer Chymotrypsinkonzentration von 1,5 µg/ml bzw. einer Konzentration von 15 µg/ml und ohne Chymotrypsin in 2,5 mM Tris/HCl pH 7,5 bei 37°C 5 min inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 5 µl Trypsininhibitor mit einer Konzentration von 50 mg/ml bzw. 5 mg/ml gestoppt. Anschließend wurden diese Vesikel 1 h bei 50 000 g (4°C) abzentrifugiert und der Niederschlag in 0,25 ml 2,5 mM Tris/HCl pH 7,5 aufgenommen. Nach der Zentrifugation wurde im Überstand nach Chymotrypsinbehandlung und ohne Chymotrypsinbehandlung die gleiche AC-Aktivität mit maximal 70 pmol x min^{-1} x mg^{-1} gefunden.

III.5.2. Detergentien

Eine weitere Möglichkeit, ein membrangebundenes Enzym aus der Membran herauszulösen, besteht in der Anwendung von Detergentien. Dazu wurde der Einfluß verschiedener Detergentien auf die AC-Aktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7. Einfluß von Detergentien auf die AC Aktivität

Detergens	Konzentration	AC-Aktivität
-	-	100 %
Lubrol PX	bis 0,5 %	100 %
Brij 56	bis 1 %	100 %
Digitonin	bis 1 %	100 %
Tween 60	10 mM	150 %
Tween 40	10 mM	150 %
Tween 85	10 mM	150 %
Triton X 405	0,1 - 1 %	75 %
Chaps	8,35 mM	50 %
SDS	0,4 %	0 %
Na-Desoxycholat	0,1 - 1 %	0 %

Tabelle 7 faßt die Ergebnisse von verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Präparationen zusammen. 20 µl Cilienmembranvesikel/Test (25 - 30 µg Protein) wurden in Anwesenheit von 0,9 mM $MnCl_2$ und 0,2 mM Na_2ATP ohne Glycerin in An- und Abwesenheit dieser Detergentien wie in Kap. II.2.6. beschrieben inkubiert. Die spezifische Aktivität ohne Detergenszusatz betrug durchschnittlich 800 pmol x min^{-1} x mg^{-1}.

III.5.3. Herauslösen der AC aus der Cilienmembran

Behandelt man Cilienmembranvesikel nur mit Detergentien, die keinen hemmenden Einfluß auf die AC-Aktivität haben und zentrifugiert sie dann 60 min bei 100 000 g ab, so befindet sich die gesamte AC-Aktivität im Niederschlag.
Die ebenfalls in der Cilienmembran lokalisierte GC wurde mit 0,5 % Lubrol PX in Gegenwart von 20 % Glycerin und 10 mM 2-ME durch Ultraschallbehandlung aus der Membran herausgelöst, nachdem zuvor mit 1 % Brij 56 50 % des Membranproteins abgelöst wurde (41).
Es wurde überprüft, ob auch die AC auf diese Weise aus der Membran herauszulösen ist:

1) Behandlung mit 1 % Brij 56

Vesikel mit einer Proteinkonzentration von 1,2 - 1,6 mg/ml wurden im Verhältniss 9:1 mit 10 % Brij 56 gemischt, kurz geschüttelt und anschließend 30 min bei 50 000 g (4°C) abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in einem Puffer bestehend aus 20 % Glycerin, 0,5 % Lubrol PX, 10 mM Thioglycerol und 5 mM Tris/Mops pH 7,4 resuspendiert. Das Volumen betrug das 0,7-fache des Volumens, das nach Mischen mit Brij 56 vorlag. In Abhängigkeit von der Präparation befanden sich im Niederschlag 50 - 70 % der eingesetzten Aktivität, im Überstand 30 - 50 %.

2) Behandlung des 50 000 g Niederschlag's mit Ultraschall

Der 50 000 g Niederschlag wurde in dem oben beschriebenen Puffer 0,7 ml-weise 15 sec. mit einem Branson Sonifier auf Stufe 5 mit Ultraschall behandelt und anschließend 1 h bei 100 000 g abzentrifugiert. Im Überstand und somit in löslicher Form befanden sich nach dieser Zentrifugation 45 - 55 % der gesamten ursprünglich eingesetzten AC-Aktivität. Im Niederschlag und damit partikulär waren entsprechend 12 - 20 % der eingesetzten AC-Aktivität. Die Ergebnisse von zwei verschiedenen Präparationen sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 zusammengefaßt.

Da die weitere Reinigung der GC und der AC parallel vorgenommen wurde, wurde diese Methode des Löslichmachens beibehalten. Für die AC empfiehlt sich jedoch nach der Brij-Behandlung eine Zentrifugation von 60 min bei 100 000 g. Es wurde überprüft, ob für das Herauslösen der AC aus der Membran die Ultraschallbehandlung notwendig ist und ob dem Niederschlag nach der 50 000 g Zentrifugation anstelle von Lubrol PX auch Brij 56 bzw. kein Detergens zugesetzt werden konnte. So wurden die Niederschläge in dem oben beschriebenen Puffer, in dem gleichen Puffer mit 0,5 % Brij 56 anstelle von Lubrol PX und in dem gleichen Puffer ohne Detergens

resuspendiert. Ein Teil dieser Proben wurde mit Hilfe eines Vortex Whirlmix kräftig geschüttelt und ein Teil wie oben beschrieben mit Ultraschall behandelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Ihr kann man entnehmen, daß auch ohne Ultraschallbehandlung die AC aus der Membran herausgelöst werden kann. Bei der dargestellten Präparation mit Lubrol PX als Detergens lag die Ausbeute nach Ultraschallbehandlung 10 % über dem Wert, den man erhielt, wenn nur geschüttelt wurde. Bei einer weiteren Präparation war die Ausbeute mit und ohne Ultraschallbehandlung mit 39 % und 40 % fast gleich.

Verwendete man Brij 56 anstelle von Lubrol PX oder setzte kein Detergens zu, so wurden ohne Ultraschallbehandlung ca. 20 % weniger Enzym aus der Membran herausgelöst als mit Ultraschallbehandlung.

Detergenszusatz nach dem Brij-Waschschritt ist ebenfalls nicht notwendig, um die AC aus der Membran herauszulösen. So wurden ohne Detergenszusatz 37 % der eingesetzten AC-Aktivität aus der Membran herausgelöst, wenn Ultraschall verwendet wurde. Die AC wurde dabei auf das 3,3-fache angereichert. Die höchste Anreicherung wurde ohne Detergenszusatz und ohne Ultraschallbehandlung auf das 4,8-fache erreicht, wobei die Proteinkonzentration sehr klein war und mit einem entsprechenden Fehler behaftet sein kann. Die Ausbeute betrug hier nur 13 %.

Wenn Ultraschall verwendet wurde, wurde mit 0,5 % Brij 56 und 0,5 % Lubrol PX die gleiche Ausbeute an löslichem Enzym erhalten; lediglich die Anreicherung auf das 3,5-fache mit Brij 56 war höher als die auf das 2,6-fache mit Lubrol PX.

Tabelle 8. Herauslösen der AC aus der Cilienmembran

Präparationsschritt	Gesamtprotein (mg)	spez. Aktivität (pmol/mgxmin)	Gesamtaktivität (nmol/min)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Vesikel	14,13	1454	20,5	100,0	
nach 50 000 g Zentrifugation:					
ÜS	5,50	1996	10,9	53,5	1.37
NS	5,16	2215	11,4	56,0	1,52
nach 100 000 g Zenrifugation:					
ÜS	3,60	3111	11,2	54,5	2,13
NS	3,15	770	2,4	11,8	0,5

9 ml Membranvesikel (14,13 mg) wurden mit 1 ml 10 % Brij 56 gewaschen und anschließend 30 min bei 50 000 g zentrifugiert. Die dabei entstehenden Niederschläge wurden in 700 µl einer Lösung bestehend aus 20 % Glycerin, 0,5 % Lubrol PX und 10 mM Thioglycerin in 2,5 mM Tris/Mops pH 7,4 resuspendiert und nach Ultraschallbehandlung 1 h bei 100 000 g abzentrifugiert.

Tabelle 9. Herauslösen der AC aus der Cilienmembran unter verschiedenen Bedingungen

Präparationsschritt	Gesamtprotein (mg)	spez. Aktivität (pmol/mgxmin)	Gesamtaktivität (nmol/min)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Vesikel	7,56	3357	25,4	100,0	
nach 50 000 g Zentrifugation:					
ÜS	3,36	2254	7,6	29,8	0.7
NS	2,28	7974	3,0	71,6	2,4
nach 100 000 g Zentrifugation:					
a : ÜS	0,22	8710	1,9	45,3	2,6
NS	0,14	5250	0,7	17,4	0,6
a': ÜS	0,17	9000	1,6	37,0	2,7
NS	0,16	9147	1,4	33,0	2,7
b : ÜS	0,17	11400	2,0	47,0	3,4
NS	0,08	12916	1,1	25,0	3,8
b': ÜS	0,10	9250	1,0	23,0	2,8
NS	0,17	11550	2,0	47,0	3,4
c : ÜS	0,13	11110	1,4	34,0	3,3
NS	0,19	8214	1,6	37,0	2,4
c': ÜS	0,04	16000	0,6	13,0	4,8
NS	0,27	8100	2,2	52,0	2,4

5,4 ml Membranvesikel wurden mit 0,6 ml 10 % Brij 56 gewaschen und anschließend 30 min bei 50 000 g 1ml-weise zentrifugiert. Die dabei anfallenden Niederschläge wurden in je 0,7 ml Puffer resuspendiert. Der Puffer setzte sich wie folgt zusammen: a und a': 0,5 % Lubrol PX, 20 % Glycerin, 10 mM Thioglycerol in 2,5 mM Tris/Mops pH 7,4; b und b': anstelle von Lubrol PX 0,5 % Brij 56 ansonsten wie a; c und c': ohne Detergens, ansonsten wie a. Anschließend wurden die Niederschläge von a, b und c mit Ultraschall behandelt, die Niederschläge von a', b' und c' 2 min mit Hilfe eines Vortex Whirlmix kräftig geschüttelt.

III.5.4. Gelchromatographie

Eine weitere Reinigung des Enzyms war mit Hilfe der Gelchromatographie möglich. Ziel war neben der weiteren Reinigung die Trennung von AC und GC.
Vorversuche wurden mit Sephacryl S 200, S 300 und S 400 gemacht. Das beste Trennergebnis wurde mit einer Doppelsäule und unter Bedingungen wie in Kap. II.2.5. beschrieben mit Sephacryl S 300 erreicht. Die Maxima der spezifischen Aktivitäten lagen hier um 3,8 ml auseinander (S. Klumpp, persönliche Mitteilung). Die maximale Anreicherung betrug das 4-fache der spezifischen Aktivität des eingesetzten löslichen Enzyms, die Wiederfindungsrate lag bei 78 %.
Ein besseres Ergebnis bezüglich der Trennung wurde mit einer Ultrogel AcA 22 Doppelsäule erreicht (nähere Bedingungen siehe Kap. II.2.5.). Die Verteilung des Proteins, der Gesamtaktivität und der spezifischen Aktivität ist in Abb. 12 dargestellt. Der Kurvenverlauf der Gesamtaktivität hat zwei Maxima, das erste zwischen Fraktion 31 und 33, das zweite zwischen Fraktion 55 und 57, wobei das erste den Ausschlußgipfel überlagert und das zweite vor dem Anstieg des zweiten Proteinpeaks wieder abfällt. Folglich sind die spezifischen Aktivitäten im Bereich der Fraktionen 52 und 58 am größten. Die maximale Anreicherung findet man in Fraktion 55. Sie beträgt das 3-fache der spezifischen Aktivität des eingesetzten löslichen Enzyms. Weitere Daten über Gesamtaktivität, spezifische Aktivität und Anreicherung sind Tabelle 10 zu entnehmen.
Die Maxima der spezifischen Aktivitäten von GC und AC lagen bei diesem Versuch 9 ml auseinander (41).

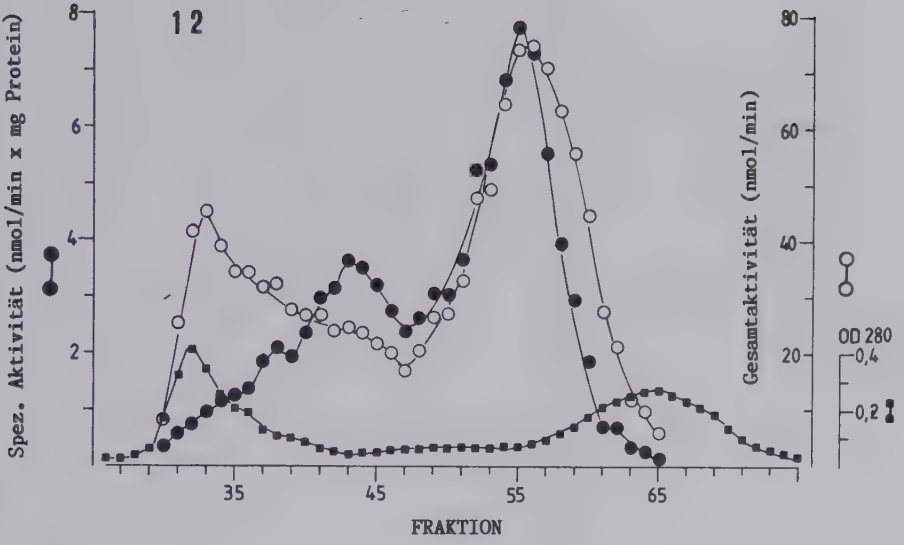


Abb. 12. Gelchromatographie mit Ultrogel AcA 22
Saülenvolumen: 70 ml
Säulenlänge: 2 x 50 cm
Säulendurchmesser: 1 cm
Equlibrierungs- und Elutionspuffer:
0,5 % Lubrol PX, 20 % Glycerin, 10 mM 2-ME,
60 mM NaCl in 2,5 mM Tris/HCl
Flußgeschwindigkeit: 4 ml/h
Ausschlußvolumen: 22 ml
Auftrag: 900 µl lösliches Enzym = 720 µg Protein

Tabelle 10. Tabelle zur Abbildung 12

	Protein (µg)	Gesamtaktivität (pmol/min)	spez.Aktivität (pmol/min x mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Auftrag:	720	1817	2524	100,0	
Wiederfindungsrate:	685	1282	878	68,5	
Fraktion 48 - 65:	313	722	2306	39,7	0,9
Fraktion 52 - 58:	89	443	5984	24,0	2,4
Fraktion 55:	9,5	74	7789	4,0	3,1

III.6. HORMONE, GTP, NaF und FORSKOLIN

III.6.1. Hormone und Neurotransmitter

Es wurde überprüft, ob Serotonin, Metenkephalin oder Leuenkephalin einen Einfluß auf die AC-Aktivität haben. Die Untersuchungen wurden in Cilienmembranvesikeln mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM Na_2ATP durchgeführt. Metenkephalin und Leuenkephalin wurden in 99 % DMSO gelöst, so daß eine Endkonzentration von 1 mM erreicht wurde. Die entsprechenden Verdünnungen wurden ebenfalls mit 99 % DMSO hergestellt. Im Test wurde durch Zugabe von jeweils 10 µl der entsprechenden Verdünnungen eine DMSO-Konzentration von 10 % erreicht. Der Kontrollwert wurde entsprechend mit 10 % DMSO angefertigt (Tabelle 11).

III.6.2. GTP

In höheren Systemen bindet GTP Mg-abhängig an die α-Untereinheit von N_s und N_i. Auf diese Weise stimuliertes N_s bewirkt eine Erhöhung der Affinität für Mg^{2+} an der katalytischen Untereinheit C auf das 100-fache, wohingegen stimuliertes N_i zu einer Abnahme der Mg^{2+}-Affinität an dieser Bindungsstelle führt. Konzentrationen von 20 mM Mg^{2+} können dabei die Wirkung von N_i völlig überdecken (22).
Aus diesem Grunde wurde ein möglicher GTP-Einfluß in unserem System bei verschiedenen freien Mg^{2+}-Konzentrationen überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

III.6.3. Anionen

Einflüße verschiedener Anionen auf die Aktivität von ACen unterschiedlicher Herkunft wurden mehrfach beschrieben. Hierzu gehört F^-, das in höheren Systemen, in denen N_s enthalten ist, in einer Konzentration von 10 mM zu einer ca. 10-fachen Aktivierung führt und in vielen niederen Systemen (z.B. E. coli, Bordetella pertussis) in dieser Konzentration

die entsprechenden ACen halbmaximal hemmt. Weiterhin wurden Aktivierungen von Herz- und Leber ACen mit Cl^-, Phosphat und Acetat in Konzentrationen von 100 mM sowie mit SCN^-, NaN_3 und Sulfat beschrieben (69 - 73).
Ein Einfluß von 10 mM NaF auf die ciliäre Paramecium AC konnte nicht festgestellt werden, wenn MnATP als Substrat diente (21). Hingegen wurde das Enzym halbmaximal gehemmt, wenn MgATP (8 mM $MgSO_4$, 1 mM TrisATP) als Substrat verwendet wurde. Die Hemmung verlief in Cilien, Cilienmembranvesikeln und löslichem Enzym völlig identisch und zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der freien Mg^{2+}-Konzentration. Dabei scheint F^- durch Interaktion an der Mg^{2+}-Bindungsstelle (siehe Kap. III.7.) eine weitere Mg^{2+}-Bindung zu verhindern (Abb. 13).
Cl^-, Br^-, und J^- waren ebenfalls in der Lage, das Enzym zu hemmen. Den stärksten Hemmeffekt besaß F^- gefolgt von J^- (50 % Hemmung mit 100 mM), Cl^- und Br^-, wobei Cl^- und Br^- in ihrer Hemmwirkung vergleichbar waren (20 % Hemmung mit 100 mM). Die Untersuchungen wurden mit den entsprechenden K^+- und Na^+-Salzen in Cilien mit 8 mM $MgSO_4$, 1 mM TrisATP und 30 % Glycerin durchgeführt. Die Aktivierung bei kleineren K^+-Konzentrationen und die generell höhere Aktivität bei den K^+-Salzen beruht auf einer spezifischen K^+-Stimulierung, auf die später eingegangen wird (Abb. 14).

III.6.4. Forskolin

Forskolin ist ein pflanzliches Diterpen, daß in einem Bereich von 1 - 100 µM fast alle ACen höherer Systeme stimulieren kann (79 - 83). Forskolinstimulierung war weder mit MgATP noch mit MnATP (J.E. Schultz, persönliche Mitteilung) als Substrat in einem Bereich von 0,1 - 100 µM zu beobachten (Tabelle 13).

Tabelle 11. Einfluß von Serotonin, Metenkephalin und Leuenkephalin auf die AC

Serotonin (µM)	spez. Aktivität (pmol/min x mg)	AC-Aktivität (%)
0	251	100
0,1	254	101
1	262	104
10	308	123
100	246	98

Metenkephalin (µM)	spez. Aktivität (pmol/min x mg)	AC-Aktivität (%)
0	508	100
0,1	496	98
1	504	99
10	529	104
100	479	94

Leuenkephalin (µM)	spez. Aktivität (pmol/min x mg)	AC-Aktivität (%)
0	508	100
0.1	496	98
1	512	101
10	500	98
100	504	99

20 µl Vesikel (30 µg Protein)/Test wurden mit 8 mM $MgSO_4$, 1 mM Tris/ATP wie in Kap. II.2.6. beschrieben inkubiert. Lösen von Leu- und Metenenkephalin sowie Inkubationsbedingungen der entsprechende Kontrollen siehe Kap. III.6.1.

Tabelle 12. Einfluß von GTP auf die AC

Na_2GTP	Mg^{2+}frei (555 µM) Aktivität	Mg^{2+}frei (1,02 mM) Aktivität
(µM)	(%)	(%)
0	100	100
1	113	90
3	103	89
6	98	88
10	98	90
30	85	74
100	75	80

10 µl lösliches Enzym (5 µg Protein)/Test wurden mit 1,46 mM bzw. 2,9 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP in Anwesenheit von 30 % Glycerin wie in Kap. II.2.6. beschrieben inkubiert. 100 % AC-Aktivität entspricht der AC-Aktivität ohne GTP-Zusatz mit 1600 (Mg^{2+}frei = 555 µM) und 2250 (Mg^{2+}frei = 1,02 mM) pmol x min^{-1} x mg^{-1}.

Tabelle 13. Forskolinwirkung auf die AC

Forskolin	spez. Aktivität	AC-Aktivität
(µM)	(pmol/min x mg)	(%)
0	375	100
0,1	358	96
1	354	94
10	367	98
100	404	107

20 µl Cilienmembranvesikel (30 µg Protein)/Test wurden in Anwesenheit von 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM Na_2ATP ohne Glycerinzusatz wie in Kap. II.2.6. beschrieben inkubiert.

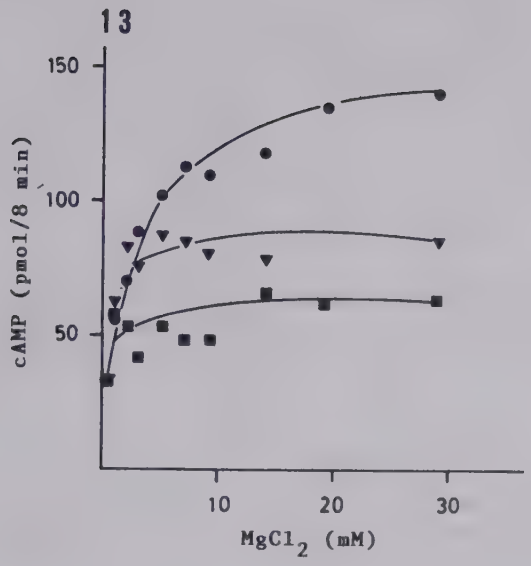


Abb. 13. $MgCl_2$-Dosiswirkungskurven mit NaF
10 µl lösliches Enzym (5 µg Protein)/Test wurden mit 1 mM TrisATP in Anwesenheit von 30 % Glycerin wie in Kap. II.2.6. beschrieben mit 10 mM NaF (■), 6 mM NaF (▼) und ohne NaF (●) inkubiert.

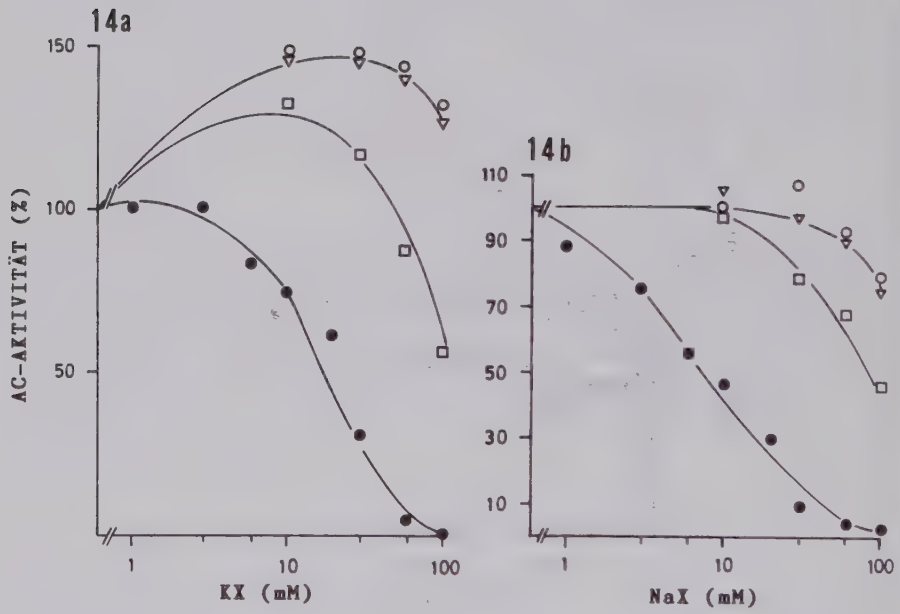


Abb. 14. Halogenid-Dosiswirkungskurven
Alle Inkubationen wurden mit 10 µl Cilien (25 µg Protein) mit 1 mM TrisATP in Anwesenheit von 30 % Glycerin durchgeführt. 100 % AC-Aktivität entspricht der AC-Aktivität ohne Halogenidzusatz (300 pmol cAMP x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$).
F^- = (●) Cl^- = (○) Br^- = (▽) J^- = (□)

III.7. ALLOSTERISCHE AKTIVIERUNG DER AC DURCH Mg^{2+} UND MgATP

III.7.1. Aufstellung eines Reaktionsschema's für die AC

Grundvoraussetzung für eine K_m-Wert Bestimmung nach Michaelis Menten ist die Übertragbarkeit der Michaelis Menten Randbedingungen auf das vorliegende experimentelle System. Ausgegangen wird dabei von folgendem Reaktionsschema:

$$E + S \underset{}{\overset{K_s}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_p} E + P$$

mit E = Enzym, S = Substrat und P = Produkt

In unserem System bindet im einfachsten Fall MgATP an die AC und der so entstandene AC•MgATP-Komplex zerfällt in Mg^{2+}, cAMP und Enzym:

$$AC + MgATP \overset{K_s}{\rightleftharpoons} AC{\bullet}MgATP \xrightarrow{k_p} Mg^{2+} + AC + cAMP$$

Eine mögliche Bindung von Mg^{2+} an cAMP ist wegen des geringen Substratumsatzes von maximal 1 % zu vernachlässigen. Berücksichtigt werden muß jedoch die Reaktion

$$Mg^{2+} + ATP \overset{K_o}{\rightleftharpoons} MgATP$$

und damit die tatsächlich vorliegende MgATP-Konzentration. Bei einer Konzentration von 8 mM $MgSO_4$ und 0,2 - 2 mM Tris-ATP liegt so gut wie alles ATP als MgATP vor. Berechnungen mit Hilfe des Programm's von Fabiato u. Fabiato ergaben unter diesen Bedingungen bei pH 7,65 für 0,2 mM TrisATP eine MgATP-Konzentration von 0,198 mM und für 2 mM TrisATP eine MgATP-Konzentration von 1,98 mM. Entscheidender ist hier die Veränderung der freien Mg^{2+}-Konzentration. Bei 0,2 mM Tris-ATP lagen 7,8 mM Mg^{2+} in freier Form vor, bei 2 mM TrisATP nur noch 6,02 mM. In Cilien wurde unter diesen Bedingungen ein sigmoider Kurvenverlauf in der S gegen v Darstellung

erhalten; der daraus ermittelte Hill-Plot hatte eine Steigung von 1,5 (Abb. 15). Dieses Ergebnis deutete auf einen allosterischen Effekt hin. Da eine Erhöhung der $MgSO_4$-Konzentration von 4 mM auf 9 mM in Cilien zu einer 1,9-fachen Erhöhung der AC-Aktivität führte (4 mM $MgSO_4$ = 40 pmol cAMP x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$, 9 mM $MgSO_4$ = 77 pmol cAMP x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$ mit 1 mM TrisATP), mußte in Betracht gezogen werden, daß freies Mg^{2+} einen Einfluß auf die Enzymaktivität hat.

Daraus ergab sich folgende Möglichkeit für ein Reaktionsschema (nach Segel (42), S. 264 ff.):

$$\begin{array}{lcl} E + A & \overset{K_A}{\rightleftharpoons} & AE \\ + & & + \\ S & \overset{K_o}{\rightleftharpoons} & AS \end{array} \qquad \text{mit A = Aktivator}$$

$$AS \rightleftharpoons AEAS \quad (K'_{SA})$$

$$AEAS \xrightarrow{k_p} AE + P + A$$

bzw.:

$$\begin{array}{lcl} AC + Mg & \overset{K_A}{\rightleftharpoons} & Mg \cdot AC \\ + & & + \\ ATP & \overset{K_o}{\rightleftharpoons} & MgATP \end{array}$$

$$Mg \cdot AC \rightleftharpoons Mg \cdot AC \cdot MgATP \quad (K'_{SA})$$

$$Mg \cdot AC \cdot MgATP \xrightarrow{k_p} Mg \cdot AC + cAMP + Mg$$

Die entsprechende Geschwindigkeitsgleichung lautet:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\dfrac{(A)^2}{K_A \times K_o \times K'_{SA}}}{1 + \dfrac{(A)}{K_A} + \dfrac{(A)^2(S)}{K_A \times K_o \times K'_{SA}}}$$

Demnach kann MgATP erst dann an das Enzym binden, wenn Mg^{2+} an das Enzym gebunden hat. Der Kurvenverlauf in der S gegen v-Darstellung ist sigmoid für den Fall, daß $S_t > A_t$ ist (S_t = Gesamtkonzentration des Substrats, hier ATP, A_t = Gesamtkonzentration des Aktivators, hier Mg^{2+}). Steigende A_t-Konzentration führt zu einer Abnahme der Sigmoidität. Bei einem konstanten Überschuß von A_t gegenüber S_t wird der Kurvenverlauf hyperbol. Für $A_t = S_t$ ist eine Linearisierung möglich, wenn 1/v gegen $1/S^2$ aufgetragen wird. Der entsprechende Hill-Plot hat in diesem Fall eine Steigung von 2 (42).
Dieses Schema wurde durch folgende Versuche bestätigt:

1) $MgSO_4$ und TrisATP wurde im Verhältniss 1:1 eingesetzt (Abb. 16a + 16b). Die S gegen v Darstellung ergab einen sigmoiden Kurvenverlauf, eine Linearisierung war durch Auftragen von $1/S^2$ gegen 1/v möglich und der entsprechende Hill-Plot hatte eine Steigung von 2.

2) Da die Mg^{2+}-Konzentration in Paramecium mit 2 - 3 mM angegeben wird, wurden Bedingungen errechnet, bei denen die freie Mg^{2+}-Konzentration über einen ATP-Bereich von 0,2 bis 2 mM wahlweise 0,55 mM, 1,02 mM 2,05 mM und 4,02 mM betrug. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms von Fabiato u. Fabiato. In allen Fällen wurde ein hyperboler Kurvenverlauf erhalten (Abb. 17a).

III.7.2. K'_m- und K_A-Bestimmung

Eine K_m-Bestimmung ist nur dann möglich, wenn die Reaktion Mg + ATP $\rightleftharpoons$ MgATP außer acht gelassen werden kann. In diesem Fall ist das Reaktionsschema wie folgt zu formulieren:

$$E + A \overset{K_A}{\rightleftharpoons} AE$$

$$AE + S \overset{K'_{SA}}{\rightleftharpoons} AES \xrightarrow{k_p} EA + P$$

bzw.:

$$AC + Mg \xrightleftharpoons{K_A} Mg \cdot AC$$

$$Mg \cdot AC + MgATP \xrightleftharpoons{K'_{SA}} Mg \cdot AC \cdot MgATP \xrightarrow{k_p} Mg \cdot AC + cAMP + Mg$$

Gleichung 1) beschreibt die entsprechende Geschwindigkeitsgleichung, Gleichung 2) die Reziprokform nach Lineweaver Burk:

Gleichung 1)
$$v = \frac{V_{max} \times S}{K'_m (1 + K_A/A) + S}$$

Gleichung 2)
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K'_m}{V_{max}} (1 + K_A/A) \frac{1}{S}$$

Aus der Lineweaver Burk Darstellung ist demnach mit dem Schnittpunkt der Abszisse ein Wert zu ermitteln, der $K'_m = (1 + K_A/A)$ entspricht und mit K_m^A bezeichnet wird. Er wird mit steigender Konzentration von A immer kleiner. K'_m ist mit Hilfe einer Sekundärdarstellung zu ermitteln, in der 1/A gegen K_m^A aufgetragen wird, da gilt:

$$K_m'^A = K'_m + K'_m \times K_A \times 1/(A)$$

Der Schnittpunkt mit der Abszisse gibt den Wert $1/K_A$ an. Abb. 17b und 18a sind die Lineweaver Burk Darstellungen von zwei Versuchen mit unterschiedlichen Enzympräparationen zu entnehmen. Die daraus ermittelten $K_m'^A$-Werte, die den freien Mg^{2+}-Konzentrationen entsprechen, sind in Tabelle 14 und 15 aufgeführt. Durch Auftragung von $1/(Mg^{2+}\text{frei})$ gegen $K_m'^A$ wurden in Abb. 17c und 18b die K'_m-Werte und die K_A-Werte ermittelt. Die K_A-Werte liegen bei einer freien Mg^{2+}-Konzentration von 1,7 und 1,3 mM, die K'_m-Werte bei 220 µM. Die K'_m Werte geben in diesem Fall die Affinität von MgATP zu der Mg-aktivierten AC wieder.

Tabelle 14. Dieser Tabelle sind die aus den graphischen Darstellungen von 17a, 17b und 17c ermittelten Werte zu entnehmen.

freies Mg^{2+}	$K_m'^A$-Wert	K_m'-Wert	K_A-Wert
(mM)	(µM)	(µM)	(mM)
0,555	892		
1,021	610	220	1,7
2,050	362		

Tabelle 15. Dieser Tabelle sind die aus den graphischen Darstellungen von Abb. 18a und 18b ermittelten Werte zu entnehmen.

freies Mg^{2+}	$K_m'^A$-Wert	K_m'-Wert	K_A-Wert
(mM)	(µM)	(µM)	(mM)
0.555	750		
1,005	545	225	1,3
2,002	400		
4,016	312		

III.7.3. Molekularer Mechanismus der Mg^{2+}-Aktivierung

Die Geschwindigkeitsgleichung, die der K_m'- und K_A-Bestimmung zu Grunde liegt, läßt sich in eine Reziprokform bringen, die eine Geradengleichung beschreibt, bei der 1/(A) der Variablen x entspricht:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m'}{S} + \frac{K_A \times K_m'}{S}\right) \frac{1}{A}$$

Diese Art der Auftragung bezeichnet man wegen ihrer Verwandtschaft zur Dixon-Auftragung als Dixon-analoge Auftragung (43). Ergibt 1/v gegen 1/(A) eine Gerade, so zeigt dies, daß pro aktives Zentrum ein Molekül A reagiert. Erhält

man erst dann eine Gerade, wenn man $1/(A)^2$ gegen 1/v aufträgt, so binden pro aktives Zentrum zwei Moleküle A. Mg^{2+}-Dosiswirkungskurven bei verschiedene konstanten MgATP-Konzentrationen sind in Abb. 19a dargestellt, die entsprechenden Dixon-analogen Auftragungen in Abb. 19b. Auftragung von $1/(Mg^{2+})$ gegen 1/v ergaben für alle drei MgATP-Konzentrationen Geraden. Daraus folgt, daß pro aktives Zentrum ein Mg^{2+}-Ion reagiert.

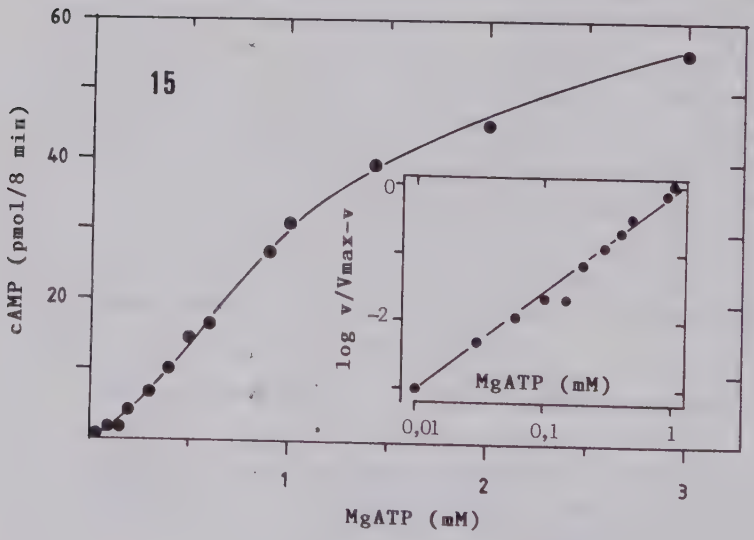


Abb. 15. Substratabhängigkeit der AC mit MgATP in Cilien
Michaelis Menten Darstellung
Insert: Hill Plot
Alle Inkubationen wurden in Anwesenheit von 8 mM $MgSO_4$ mit 10 µl Cilienprotein (22 µg Protein)/Test wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt.

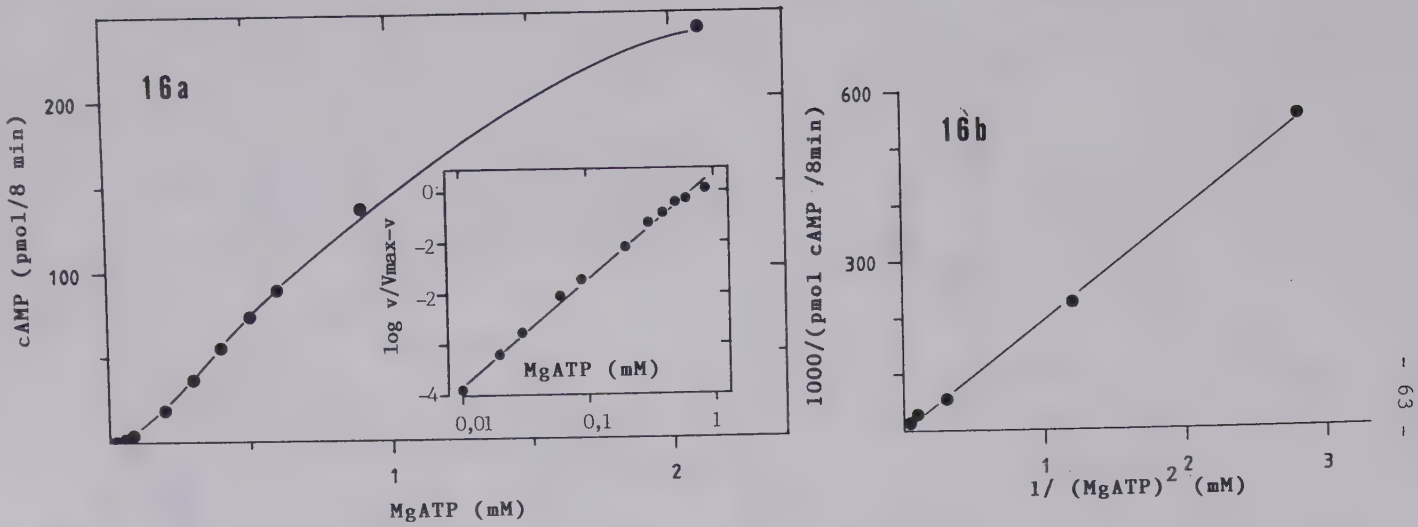


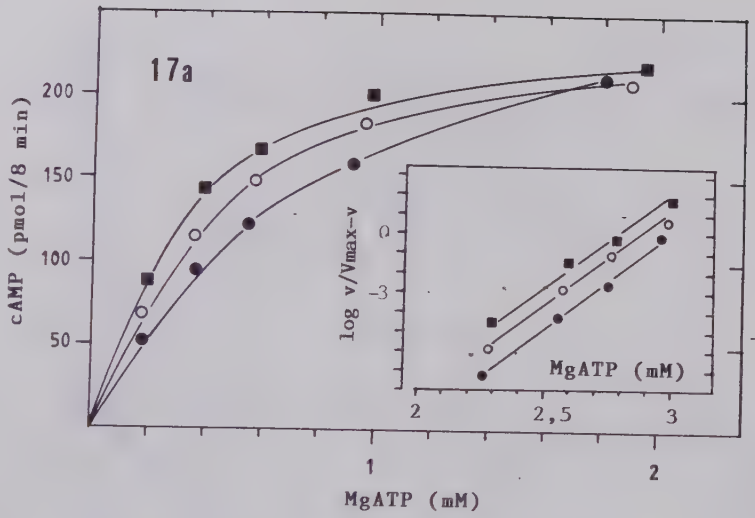
Abb. 16. Substratabhängigkeit der löslichen AC mit Mg:ATP = 1:1

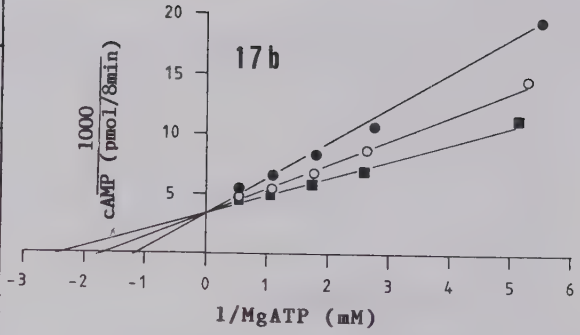
a: Michaelis Menten Darstellung

Insert: Hill Plot

b: 1/v gegen $1/S^2$

Alle Inkubationen wurden mit 10 µl löslichem Enzym (5,4 µg Protein)/Test wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt.





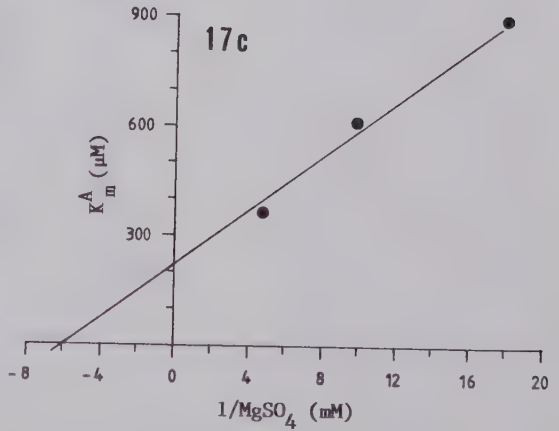


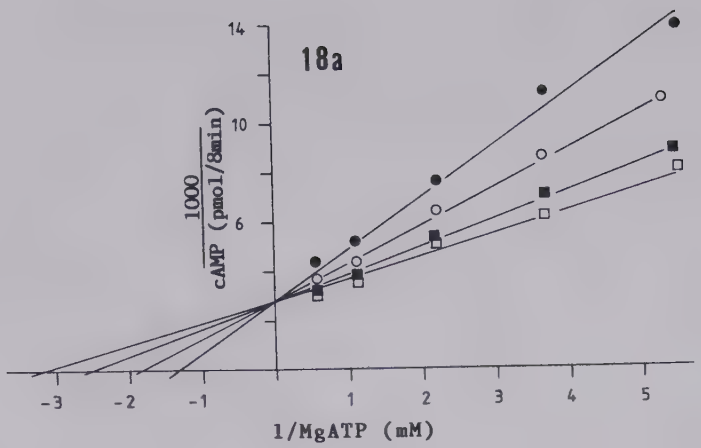
Abb. 17: Substratabhängigkeit der löslichen AC mit MgATP und konstanten Mg^{2+}-Überschuß

a: Michaelis Menten Darstellung mit 0,55 mM (●), 1,02 mM (○) und 2,05 mM (■) freiem Mg^{2+}

b: Lineweaver Burk Darstellung

c: Sekundärdarstellung zu b) zur Ermittlung von K'_m.

Alle Inkubationen wurden mit 10 µl löslichem Enzym (4,8 µg Protein)/Test durchgeführt.



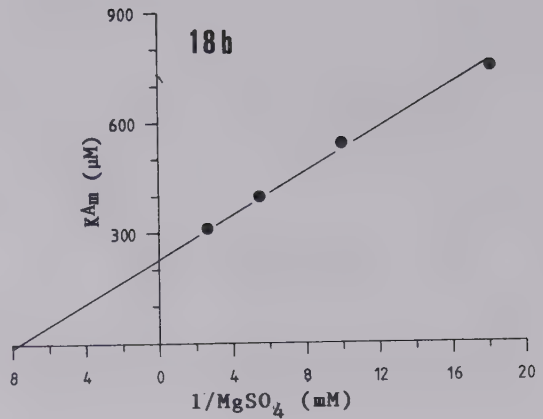


Abb. 18. Substratabhängigkeit der löslichen AC mit MgATP und konstantem Mg^{2+}-Überschuß

a: Lineweaver Burk Darstellung mit 0,55 mM (●), 1,02 mM (○), 2,05 mM (■) und 4,02 mM (□) freiem Mg^{2+}.

b: Sekundärdarstellung zu a) zur K'_m-Bestimmung

Alle Inkubationen wurden mit 10 µl löslichem Enzym (5 µg Protein)/Test wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt.

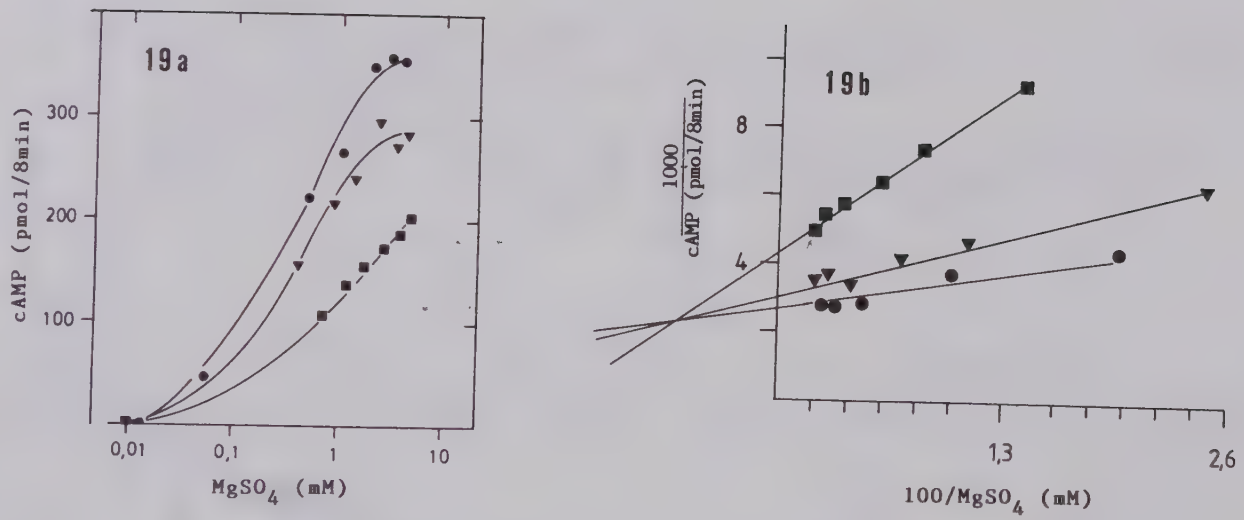


Abb. 19. Mg^{2+}-Abhängigkeit der AC bei verschiedenen konstanten MgATP-Konzentrationen
a: Direkte Darstellung mit 292 µM (■), 596 µM (▼) und 992 µM (●) MgATP
b: Dixon-analoge Auftragung
Alle Inkubationen wurden mit 10 µl löslichem Enzym (5 µg Protein)/Test wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt.

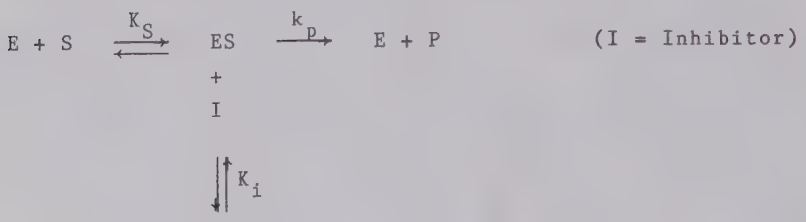
III.8. Ca^{2+}-HEMMUNG

Wurde die AC mit MnATP als Substrat getestet, so fand man mit Ca^{2+} eine Hemmung in einem Konzentrationsbereich, in dem die zur Verfügung stehende MnATP-Konzentration durch Bildung von CaATP reduziert wurde (37). Anders verhielt es sich mit MgATP als Substrat. Hier wurde eine Hemmung durch Ca^{2+} in einem Konzentrationsbereich beobachtet, in dem die Wirkung von CaATP als Falschsubstrat noch nicht in Frage kam.

III.8.1. Hemmechanismus

Mit Hilfe des Programm's von Fabiato u. Fabiato wurden Bedingungen errechnet, bei denen
1) die freien Mg^{2+}- und freien Ca^{2+}-Konzentrationen konstant gehalten wurden, während MgATP von 0,2 bis 2 mM variiert wurde.
2) die freie Mg^{2+}-Konzentration und die MgATP-Konzentrationen konstant gehalten wurden, während Ca^{2+} von 0,4 µM bis 100 µM variiert wurde.
Bei diesen Berechnungen wurde eine Ca^{2+}-Konzentration von 10 µM bedingt durch Verunreinigungen im Inkubationsansatz zu Grunde gelegt. Zusatz von 10 µM EGTA führte in Abhängigkeit von der Mg^{2+}- und ATP-Konzentration zu einer freien Ca^{2+}-Konzentration von 0,4 - 0,5 µM.
MgATP-Dosiswirkungskurven bei verschiedenen freien Mg^{2+}-Konzentrationen und freien Ca^{2+}-Konzentrationen sind in Abb. 20a, 21a und 22a dargestellt, die entsprechenden Linearisierungen nach Lineweaver Burk in Abb. 20b, 21b und 22b. Ca^{2+}-Dosiswirkungskurven bei konstanter freier Mg^{2+}-Konzentration und drei verschiedenen MgATP-Konzentrationen sind Abb. 23a zu entnehmen, die dazugehörigen Dixon-Darstellungen Abb. 23b. Lineweaver Burk und Dixon Darstellungen ergaben in allen Fällen Geraden, die für die entsprechende freie Mg^{2+}-Konzentration parallel verliefen. Dies sprach für den an sich seltenen Fall einer unkompetitiven Hemmung.

Die unkompetitive Hemmung läßt sich mit folgendem Reaktionsschema beschreiben (nach Segel (42), S. 136 ff.):



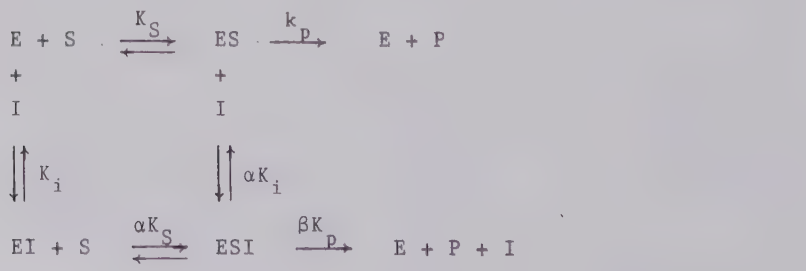
Die dazugehörige Geschwindigkeitsgleichung lautet:

$$\frac{v}{V_{maxi}} = \frac{S}{K_m + S}$$

mit $V_{maxi} = V_{max}/(1 + I/K_i)$

und $K_m = K_m/(1 + I/K_i)$

Dieser Geschwindigkeitsgleichung ist zu entnehmen, daß K_m und V_{max} mit steigender Inhibitorkonzentration um den gleichen Faktor $1 + I/K_i$ kleiner werden.
Häufiger als die unkompetitive Hemmung ist die Mixed-Type-Hemmung mit $\alpha = \beta$. Folgendes Reaktionsschema liegt dieser Hemmung zu Grunde (nach Segel (42), S. 188 ff.):



Auch hier ergeben die Lineweaver Burk Darstellungen Geraden, die bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen parallel verlaufen. Anders verhält es sich mit den entsprechenden Dixon-Darstellungen. Da hier der ESI-Komplex ebenfalls in der Lage ist, Produkt zu bilden, wird bei konstantem S für genügend hohe Inhibitorkonzentrationen für V_{max} ein Grenzwert erreicht, der βV_{max} entspricht. Dixon Darstellungen ergeben aus diesem Grunde für die Mixed-Type-Hemmung mit $\alpha = \beta$ hyperbol verlaufende Kurven (42). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Ca^{2+}-Dosiswirkungskurven bis zu 3 mM freies Ca^{2+} angefertigt. Die entsprechenden Dixon-Darstellungen bei einer freien Mg^{2+}-Konzentration von 0,555 mM bei 3 verschiedenen MgATP-Konzentrationen ergaben in allen Fällen Geraden (Abb. 24). Es lag somit kein Anhaltspunkt für eine Mixed-Type-Hemmung mit $\alpha = \beta$ vor.

III.8.2. K_i-Wert Ermittlung

Im Falle der unkompetitiven Hemmung ist der K_i-Wert mit Hilfe einer Sekundärdarstellung zu ermitteln, da gilt:

$$V_{maxi} = V_{max}/(1 + I/K_i)$$

bzw.

$$\frac{1}{V_{maxi}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max} \times K_i \times I}$$

Trägt man also I gegen $1/V_{maxi}$ auf, so kann man mit Hilfe des Schnittpunktes auf der x-Achse den K_i-Wert ablesen. Die aus den Abbildungen 20b, 21b und 22b ermittelten Sekundärdarstellungen ergeben für 0,555 mM freies Mg^{2+} einen K_i-Wert von 10 µM, für 1,02 mM freies Mg^{2+} einen K_i-Wert von 20 µM und für 2,07 mM freies Mg^{2+} einen K_i-Wert von 50 µM.

III.8.3. Hemmwirkung von La^{3+}, Ba^{2+} und Sr^{2+}

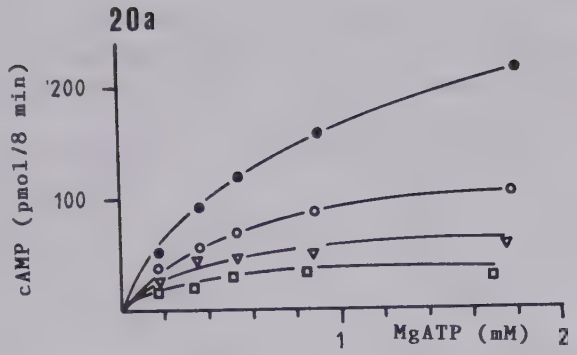
Sowohl La^{3+} als auch Ba^{2+} und Sr^{2+} sind in der Lage, die mit MgATP aktivierte AC zu hemmen. Sie unterscheiden sich allerdings stark in ihrer Hemmwirkung. Die stärkste Hemmwirkung hat La^{3+}, gefolgt von Ca^{2+}, Sr^{2+} und Ba^{2+} (Abb. 26).

III.8.4. Reversibilität der Ca^{2+}-Hemmung

Mit Hilfe von EGTA-Zugabe wurde überprüft, ob eine durch Ca^{2+} verursachte Hemmung reversibel ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefaßt.

Tabelle 16. Aufhebung der Ca^{2+}-Hemmung mit EGTA

EGTA (µM)	cAMP (pmol/8min)	
10	29	
20	37	10 µl lösliches Enzym
30	39	(5 µg) wurden mit 1,46
60	63	mM $MgSO_4$, 1 mM TrisATP
100	72	und 27 µM freiem Ca^{2+}
Kontrolle ohne Ca^{2+}	90	wie unter Kap. II. beschrieben inkubiert.



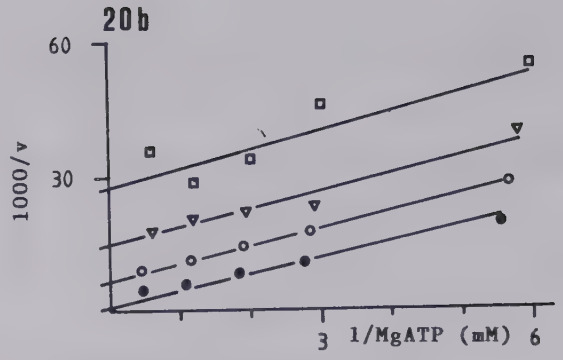
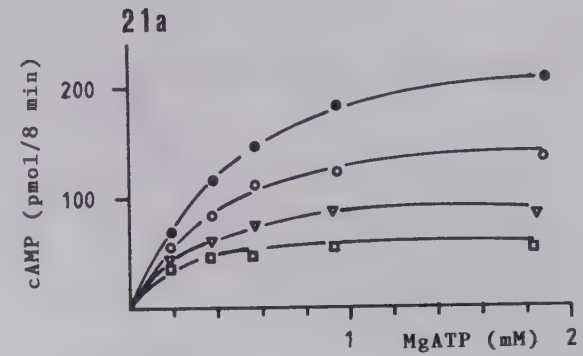


Abb. 20. Ca^{2+}-Hemmung in Anwesenheit von 0,55 mM freiem Mg^{2+}



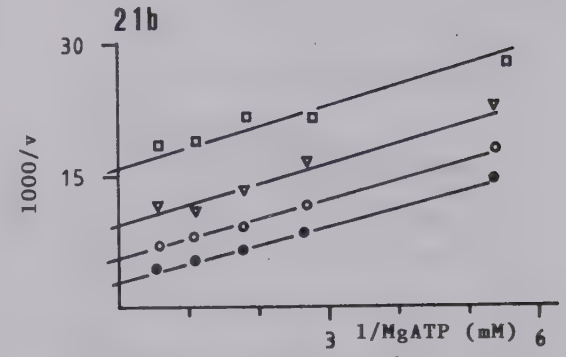


Abb. 21. Ca^{2+}-Hemmung in Anwesenheit von 1,02 mM freiem Mg^{2+}

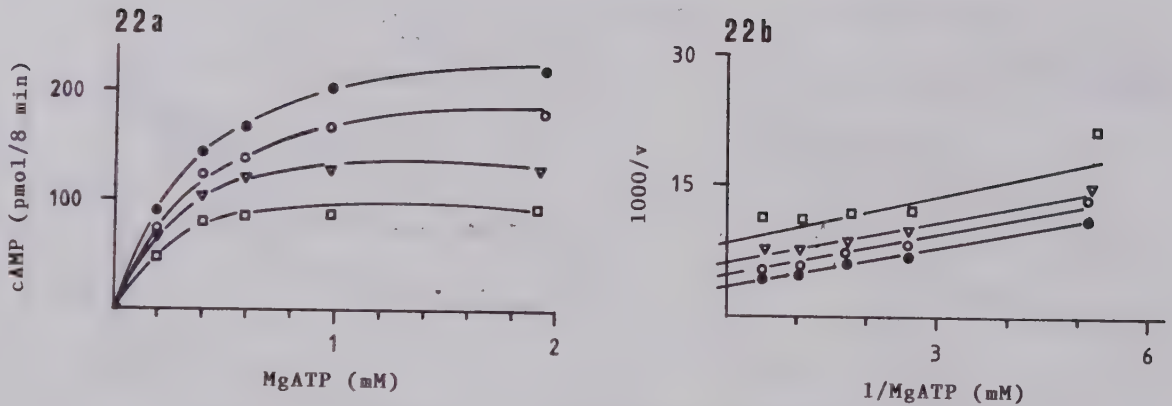


Abb. 22. Ca^{2+}-Hemmung in Anwesenheit von 2,05 mM freiem Mg^{2+}

Abb. 20a, 21a, 22a: Michaelis Menten Darstellung mit 0,4 µM (●), 27 µM (○), 60 µM (▽) und 95 µM (□) freiem Ca^{2+}

Abb. 20b, 21b, 22b: Lineweaver Burk Darstellungen zu 20a, 21a und 22a.

Alle Inkubationen wurden mit 10 µl löslichem Enzym (4,8 µg Protein)/Test wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt.

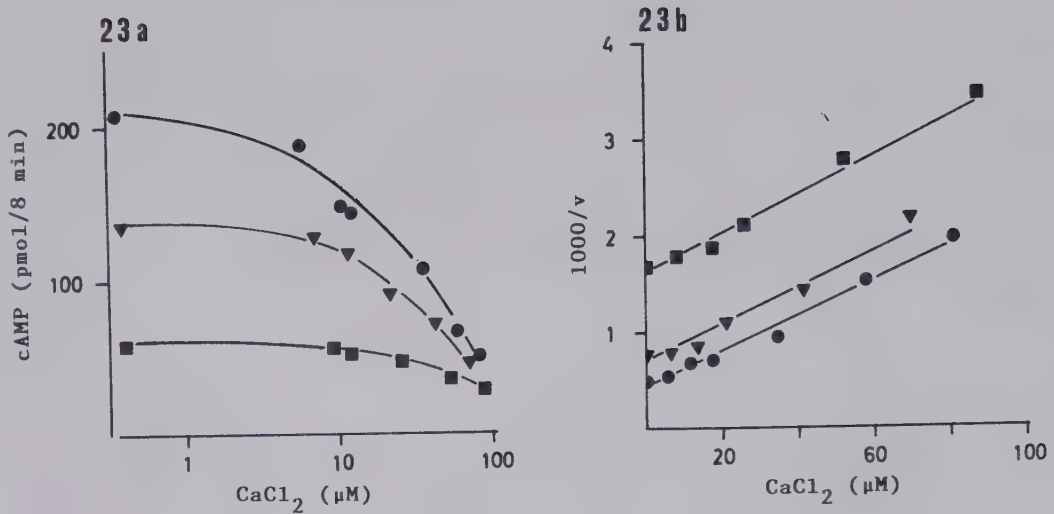


Abb. 23. Ca^{2+}-Hemmung der AC in Anwesenheit von 0,55 mM freiem Mg^{2+}
a: Ca^{2+}-Dosiswirkungskurven mit 180 µM (■), 540 µM (▼) und 900 µM (●) MgATP.
b: Dixon Darstellung zu a)
Alle Inkubationen wurden mit 10 µl löslichem Enzym (4,8 µg Protein)/Test wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt.

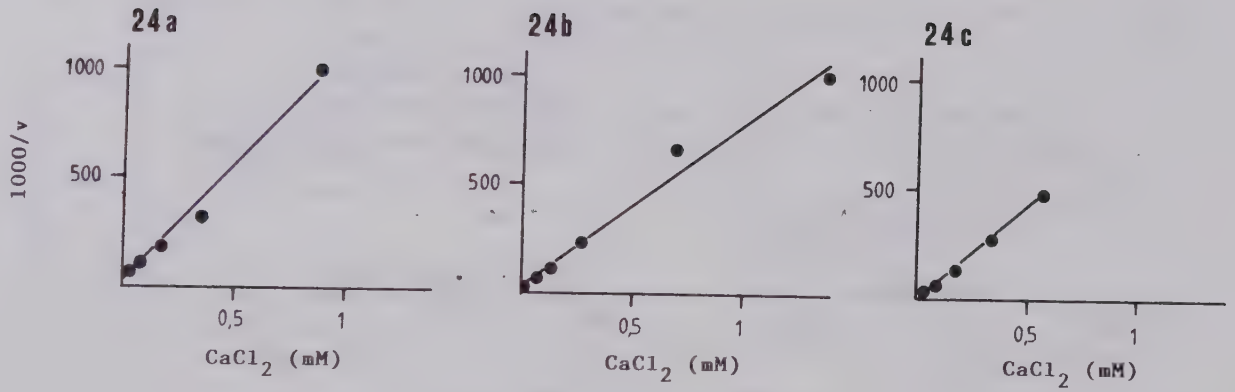


Abb. 24. Dixon Darstellungen von Ca^{2+}-Dosiswirkungskurven

a: mit 180 µM MgATP

b: mit 540 µM MgATP

c: mit 900 µM MgATP

Alle Inkubationen wurden mit 10 µl löslichem Enzym (5 µg Protein)/Test wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt.

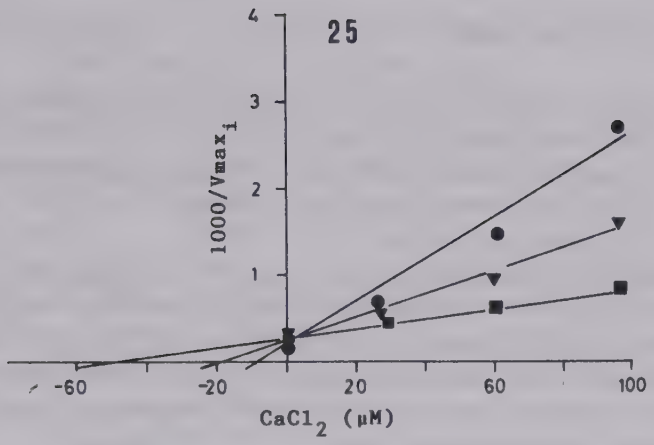


Abb. 25. Sekundärdarstellung zur K_i-Wert Ermittlung für Ca^{2+} zu Abb. 20 (●), 21 (▼) und 22 (■)

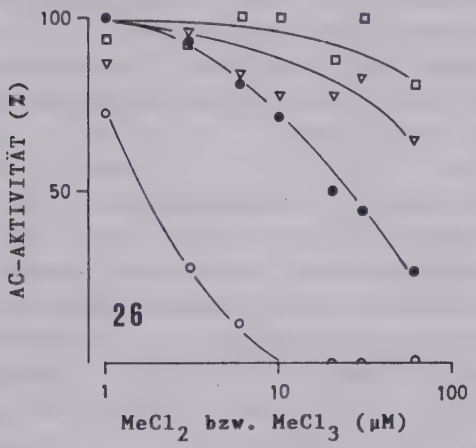


Abb. 26. Hemmung der AC durch Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+} und La^{3+} Diese Untersuchungen wurden mit 1 mM $MgSO_4$, 1 mM TrisATP und 10 µl löslichem Enzym (5,4 µg Protein) /Test wie in Kap. II.2.6. beschrieben durchgeführt. Ca^{2+} = (●) Sr^{2+} = (▽) Ba^{2+} = (□) La^{3+} = (○) 100 % AC-Aktivität entspricht der Aktivität ohne $Me^{2+/3+}$ (3400 pmol cAMP/min x mg Protein).

III.9. K^+-STIMULIERUNG

Testet man die AC in Cilien, so läßt sich in Anwesenheit von 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP mit 20 mM KCl eine 1,6 - 2-fache Aktivierung erreichen. Diese Aktivierung ist spezifisch für K^+. Na^+ hat in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 100 mM keinen Einfluß (Abb. 27a).
Verwendet man MnATP anstelle von MgATP, so findet man mit 0,9 mM $MnCl_2$ und 0,2 mM TrisATP eine K^+-Stimulierung, die zu höheren Konzentrationen hin verschoben ist. Diese K^+-Stimulierung ist nicht mehr spezifisch. Auch für Na^+ findet man eine Aktivierung, die 10 - 50 % unter derjenigen liegt, die man mit K^+ erreicht (Abb. 27b).
In Vesikeln findet man mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP mit 20 mM KCl eine Aktivierung auf 135 %. Na^+ hat keinen nennenswerten Einfluß, Li^+ hemmt in einer Konzentration von 100 mM halbmaximal und Rb^{2+} kann wie Kalium die AC aktivieren, nur wesentlich schwächer (Abb. 28).
In löslichem Enzym war die Höhe der K^+-Stimulierung mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP vergleichbar mit der in Vesikeln unter gleichen Bedingungen.

III.9.1. Stabilität der K^+-Stimulierung

Da in Vesikeln und löslichem Enzym die K^+-Stimulierung deutlich unter der von Cilien lag, mußte überprüft werden, ob während der Präparation der Teil, der für die K^+-Stimulierung verantwortlich ist, verloren geht. Aus diesem Grunde wurden Cilien bei 0°C 10 h inkubiert. Parallel dazu wurden Cilien mit einem Proteasehemmcocktail wie in Kap. III.2.6. beschrieben und mit 66 % Glycerin bei 0°C 10 h inkubiert.
Wie Tabelle 17 zu entnehmen ist, geht die K^+-Stimulierbarkeit schon während der Lagerung bei 0°C verloren, wobei dieser Verlust durch Anwesenheit eines Proteasehemmcocktails nicht aufzuhalten ist. Eine Stabilisierung wird durch Glycerin erreicht.

Tabelle 17. Einfluß von Glycerin und Proteasehemmern auf die Stabilität der Kaliumstimulierung

KCl	-80°C Kontrolle	0°C 10 h ohne Zusatz	0°C 10 h 66% Glycerin	0°C 10 h PHC
0	100 %	100 %	100 %	100 %
10 mM	140 %	110 %	150 %	100 %
20 mM	160 %	120 %	155 %	110 %

100 µl Cilien (500 µg Protein)/Test wurden jeweils mit 200 µl 2,5 mM Tris/Mops, 200 µl Glycerin und 200 µl Proteasehemmcocktail (PHC) 10 h bei 0°C inkubiert. Pro Test wurden 30 µl dieses Inkubationsansatzes entnommen. Die Inkubationen erfogten in Anwesenheit von 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP wie in Kap. II.2.6. beschrieben. 100 % AC-Aktivität entsprechen einer spezifischen Aktivität von 515 (-80°C), 365 (ohne Zusatz), 805 (66 % Glycerin) und 252 (PHC) pmol cAMP x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$.

III.9.2. Glycerindecilierung

Aus den Versuchen unter III.9.1. konnte man schließen, daß unter Umständen während der normalen Cilien- und Vesikelpräparation ein Teil der K^+-Stimulierbarkeit verloren geht. Da Glycerin ein idealer Stabilisator sowohl für das Enzym selber als auch für die K^+-Stimulierung war, wurde in Anwesenheit von 70 % Glycerin bei -20°C deciliert. Mit einer maximal zweifachen Stimulierung war hier der K^+-Effekt nicht höher als in Ca^{2+}-Schock-decilierten Cilien.

III.9.3. Faktoren ohne Einfluß auf die K^+-Aktivierung

Um zu untersuchen, ob bestimmte Inkubationsbedingungen die K^+-Stimulierung beeinflußen, wurden diese variiert und mit und ohne KCl getestet. Verwendet wurden Cilienmembranvesikel mit 8 mM $MgSO_4$, 1 mM TrisATP in An- und Abwesenheit von 10 und/oder 20 mM KCl.
Die K^+-Stimulierung wurde nicht beeinflußt durch:
1) den pH-Wert während der Inkubation (Abb. 29)
2) die Inkubationsdauer. Inkubationen, die in einem Bereich von 1 bis 10 min lagen, zeigten zu jedem Zeitpunkt die gleiche Stimulierung mit 20 mM KCl von 130 %.
3) die eingesetzten Proteinmenge (Abb. 30)
4) Gycerinanwesenheit (Abb. 30)
5) die Inkubationstemperatur. Die Aktivierungsenergie betrug mit und ohne 20 mM KCl 119 kJ/mol.
6) ein regenerierendes System (Abb. 31). Diese Versuche wurden mit Cilien gemacht, da nur hier ein Effekt von KK und KP festzustellen war. Die Aktivierung ist mit und ohne KK und KP gleich. Die Versuche wurden in der Regel ohne regenerierendes System durchgeführt.
7) Anwesenheit von NaCl. Zusatz von 1 - 20 mM NaCl verändert die Höhe der K^+-Stimulierung nicht.

III.9.4. Einfluß der freien Mg^{2+}-Konzentration

Eingangs wurde beschrieben, daß mit einer Erhöhung der $MnCl_2$-Konzentration auf das 10-fache eine Kaliumstimulierung vollständig unterdrückt werden kann. Den ersten Hinweis dafür, daß auch die freie Magnesiumkonzentration die Höhe der Aktivierung beeinflußt, erbrachte eine Mg^{2+}-Dosiswirkungskurve mit Cilien in An- und Abwesenheit von 20 mM KCl (Abb. 32a). Zwischen 8 und 10 mM $MgSO_4$ wird ein Maximum in der Kaliumstimulierung erreicht. Abb. 32b zeigt den prozentualen Anteil einer durch 20 mM KCl hervorgerufenen Aktivierung in Abhängigkeit von der freien Mg^{2+}-Konzentration mit solubilisiertem Enzym und mit Membranvesikeln. In beiden

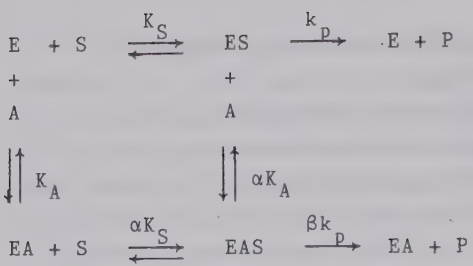
Fällen wurde mit einer TrisATP-Konzentration von 1 mM gearbeitet. Die Hemmung der Kaliumaktivierung wurde im Vergleich zu Cilien mit löslichem Enzym und mit Vesikeln bei deutlich geringeren freien Mg^{2+}-Konzentrationen sichtbar. Bei 8 mM $MgSO_4$ (= 7 mM Mg^{2+}frei) und 1 mM TrisATP ist mit 20 mM KCl sowohl in Vesikeln als auch mit löslichem Enzym nur noch eine Aktivierung auf 135 % möglich. Diese Daten erklären, warum K^+-Stimulierung in Cilien mit der in Vesikeln und löslichem Enzym anfangs nicht vergleichbar war.
Bei 1 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP lagen nach Berechnungen nach Fabiato u. Fabiato 0,22 mM Magnesium in freier Form vor. In Abhängigkeit von der Präparation wurden mit 20 mM KCl Aktivierungen zwischen 2,3 und 2,8-fach gefunden. Bei einer freien Mg^{2+} von 55 µM betrug die Stimulierung das 3,5 - 4-fache. Allerdings lag hier der Basiswert mit 2 pmol/8min im Vergleich zu 35 pmol/8min bei 0,555 mM Mg^{2+}frei sehr niedrig.

III.9.5. KCl-Dosiswirkungskurven

Bei verschiedenen freien Mg^{2+}-Konzentrationen wurden KCl-Dosiswirkungskurven angefertigt, um zu sehen, ob sich das Maximum dieser Kurven in Abhängigkeit von der Mg^{2+}-Konzentration verschiebt. Für 55 µM und 0,555 mM freies Mg^{2+} findet man wie in Cilien auch mit löslichem Enzym maximale Aktivitäten zwischen 10 und 30 mM KCl (Abb. 23).

III.9.6. Beeinflußung von K_m^A und V_{max} durch KCl

Es galt zu klären, ob K^+ lediglich die Geschwindgkeit der cAMP-Bildung erhöht oder ob die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mit einer Erhöhung der Affinität des Enzyms zum Substrat einhergeht. Da K^+ nicht notwendig für die Enzymaktivität als solche ist, gilt für den Reaktionsmechanismus folgende allgemeine Schema (nach Segel (42), S. 227 ff.):



Wie Abb. 34a, 34b , 34c und 34d zu entnehmen ist, verändert die Anwesenheit von Kalium unabhängig von der freien Mg^{2+}-Konzentration nur V_{max}. Der entsprechende K_m^A-Wert bleibt mit und ohne Kalium in allen Fällen unverändert. Bezogen auf das allgemeine Reaktionsschema gilt für die K^+-Aktivierung folgender allgemeine Fall:

$\alpha = 1$ und $\beta > 1$

III.9.7. K_i-Wert für Calcium mit 20 mM KCl

Da die freie Mg^{2+}-Konzentration einen entscheidenden Einfluß auf die Höhe der K^+-Stimulierung hatte, wurde der Einfluß der Ca^{2+}-Hemmung auf die K^+-Stimulierung untersucht. Es wurde eine K_i-Wert Bestimmung für Ca^{2+} mit 0,555 mM Mg^{2+}frei in An- und Abwesenheit von 20 mM KCl angefertigt. Die Höhe der K^+-Stimulierung wurde durch 0 - 60 µM freies Ca^{2+} nicht beeinflußt. Die mit Hilfe der Abbildungen 35a - 35e ermittelten K_i-Werte für Ca^{2+} sind mit 10 µM in An- und Abwesenheit von 20 mM KCl gleich. Die Werte mit 96 µM freiem Ca^{2+} müssen außer Betracht gelassen werden, da bei dieser Ca^{2+}-Konzentration keine K^+-Aktivierung mehr feststellbar war.

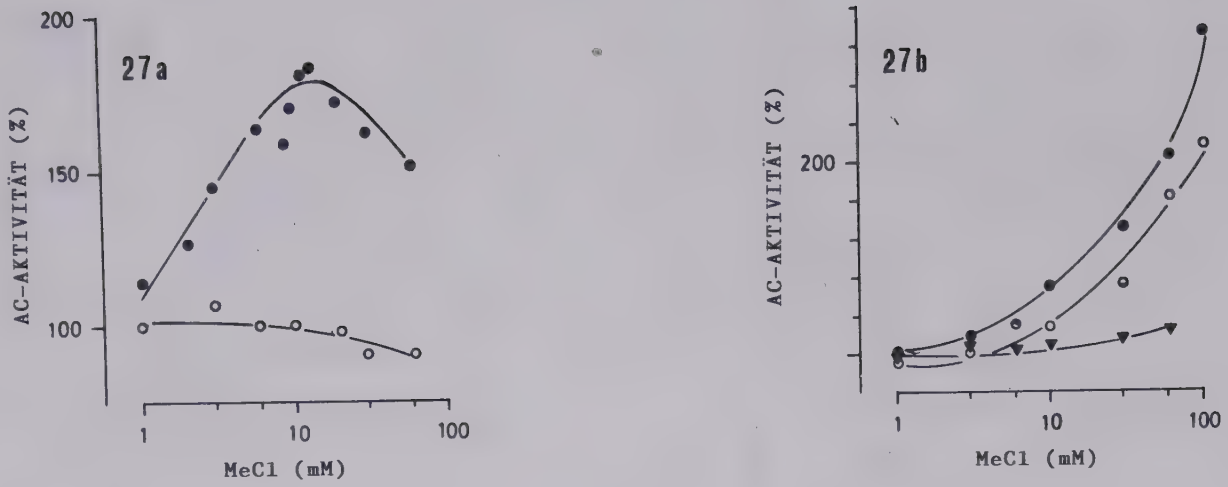


Abb. 27. Einfluß von KCl und NaCl auf die AC in Cilien
a: KCl- (○) und NaCl- (○) Dosiswirkungskurven mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP
b: KCl- (● , ▼) und NaCl- (○) Dosiswirkungskurven mit 0,9 mM $MnCl_2$ (● , ○), 9 mM $MnCl_2$ (▼) und 0,2 mM TrisATP.

Pro Inkubationsansatz wurden 10 µl Cilien (22 µg Protein) eingesetzt. 100 % AC-Aktivität entspricht der Aktivität ohne MeCl-Zusatz. Die spezifischen Aktivitäten betrugen für a) 210, für b) 597 (0,9 mM $MnCl_2$) und 450 (9 mM $MnCl_2$) pmol cAMP x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$.

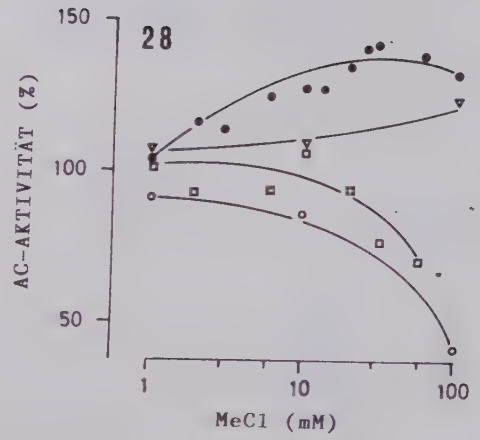


Abb. 28. Einfluß von K^+, Na^+, Li^+ und Rb^+ auf die AC in Vesikeln
Getestet wurde in Anwesenheit von 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP. Pro Test wurden 20 µl Vesikel (30 µg Protein) eingesetzt. 100 % = AC-Aktivität ohne
MeCl (125 pmol cAMP/min x mg Protein)
KCL = (●) NaCl = (□)
RbCl = (▽) LiCl = (○)

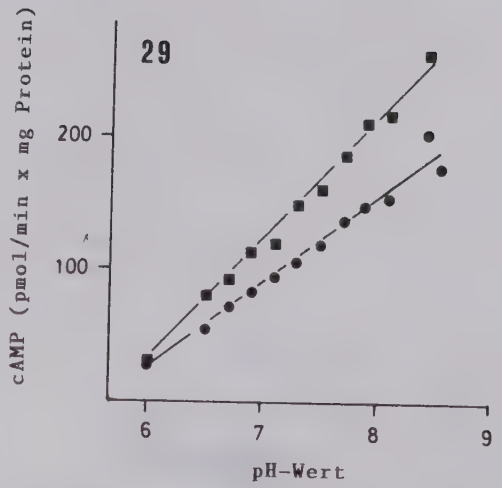


Abb. 29. pH-Abhängigkeit der AC mit und ohne 20 mM KCl
Getestet wurde mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM Tris-ATP in An- (■) und Abwesenheit (●) von 20 mM KCl. pH-Werte wurden wie in Kap. III.4.4. beschrieben mit Tris/Mops-Puffern bei 37°C eingestellt. Pro Test wurden 20 µl Vesikel (30 µg Protein) eingesetzt.

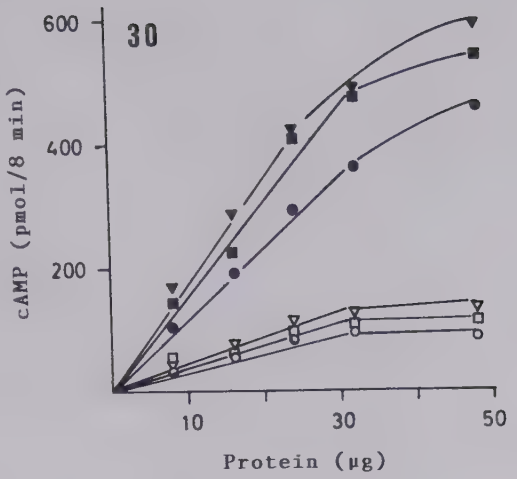


Abb. 30. Proteinabhängigkeit der AC in An- und Abwesenheit von KCl und Glycerin

Pro Test wurden 20 µl Vesikel (30 µg Protein) mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP mit (●,▼,■) und ohne (○,▽,□) 20% Glycerin und mit 20 mM KCL (▽▼), 10 mM KCl (□■) und ohne KCl (○●) inkubiert.

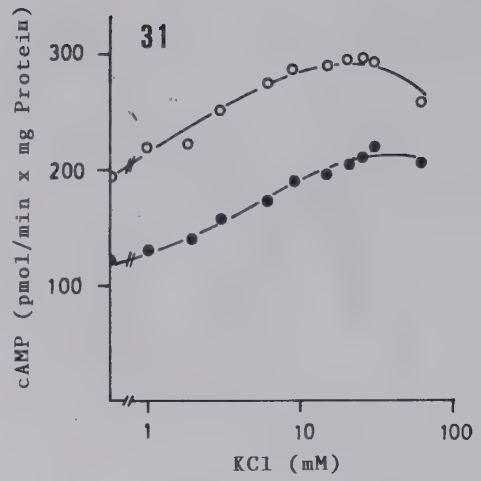


Abb. 31. KCl-Dosiswirkungskurven mit und ohne regenerierendem System

Diese Untersuchungen wurden mit 10 µl Cilien (50 µg Protein)/Test mit 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM TrisATP in An-(○) und Abwesenheit (●) von 3,6 U KK und 2,8 mM KP angefertigt.

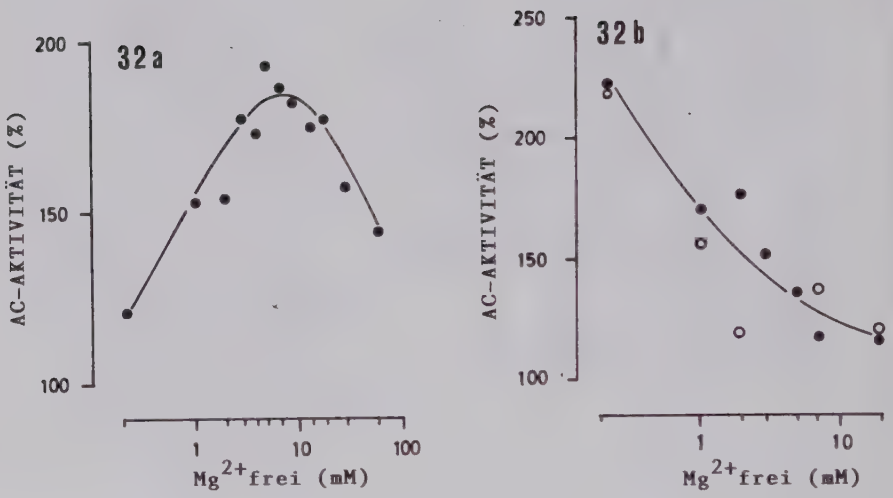


Abb. 32: Stimulierung der AC durch KCl in Abhängigkeit von der freien Mg^{2+}-Konzentration

a: mit Cilien (25 µg Protein/Test)

b: mit Vesikeln (30 µg Protein/Test) (○) und löslichem Enzym (5 µg Protein/Test) (●)

100 % AC-Aktivität entspricht der AC-Aktivität ohne KCl-Zusatz bei der entsprechenden freien Mg^{2+}-Konzentration.

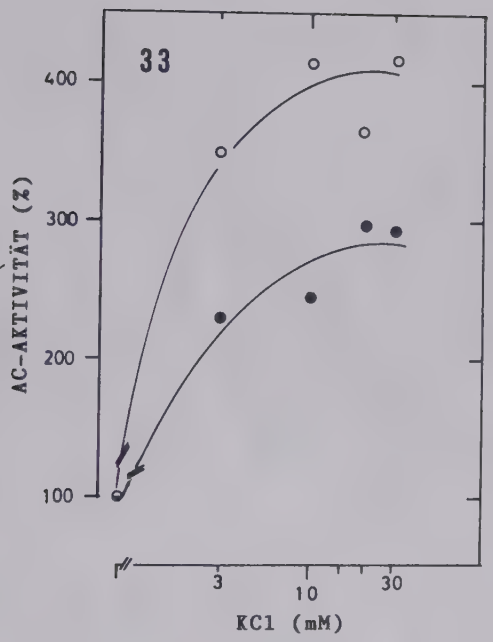


Abb. 33. KCl-Dosiswirkungskurven bei verschiedenen freien Mg^{2+}-Konzentrationen

Diese Untersuchungen wurden in Anwesenheit von 1 mM MgATP, 55 µM (●) und 550 µM (○) freiem Mg^{2+} mit löslichem Enzym (5 µg/Test) durchgeführt. 100 % AC-Aktivität entspricht der Aktivität ohne KCl-Zusatz mit 50 (55 µM Mg^{2+}) und 925 (550 µM Mg^{2+}) pmol cAMP/min x mg Protein.

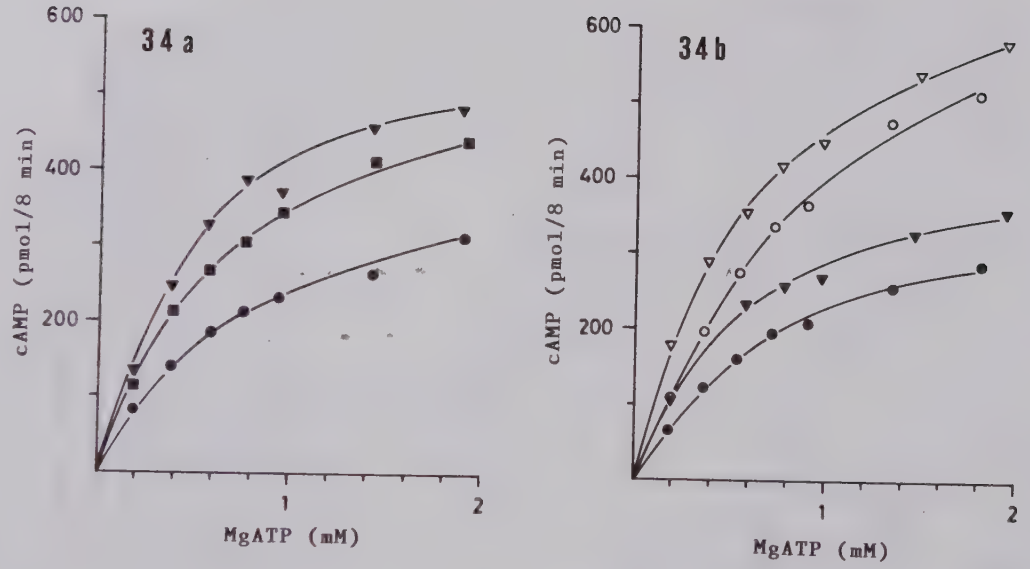
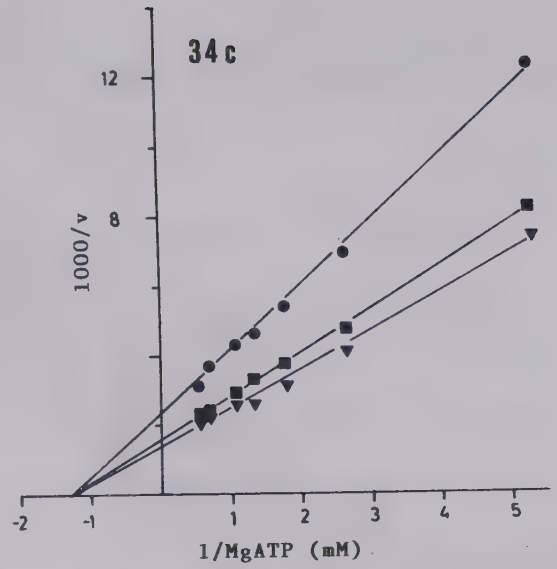
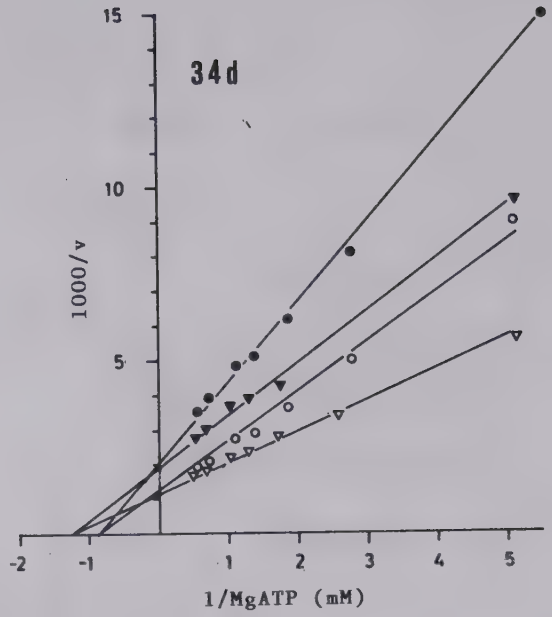


Abb. 34. Beeinflußung von K_m^A und V_{max} durch KCl

a: Michaelis Menten Darstellung bei einer freien Mg^{2+}-Konzentration von 1,02 mM .
(●) = ohne KCl (■) = 3 mM KCl (▼) = 20 mM KCl

b: Michaelis Menten Darstellung mit 0,55 mM (● , ○) und 2,05 mM (▼ , ▽) freiem Mg^{2+}
(▼●) = ohne KCl (▽○) = 20 mM KCl





34c: Lineweaver Burk Darstellung zu 34a)
34d: Lineweaver Burk Darstellung zu 34b)
Alle Inkubationen wurden mit 10 µl löslichem Enzym (5 µg Protein)/Test durchgeführt.

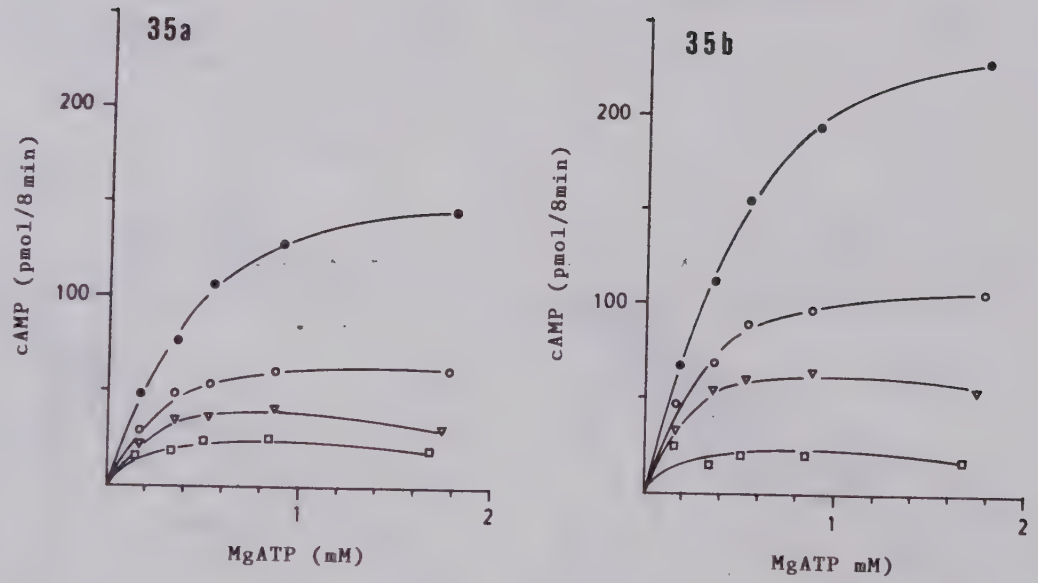
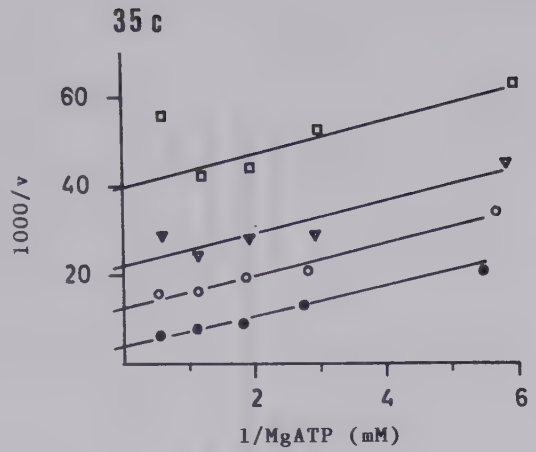
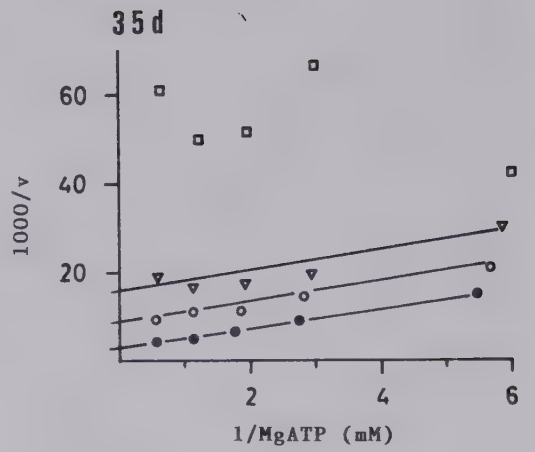


Abb. 35. Ca^{2+}-Hemmung der AC in An- und Abwesenheit von 20 mM KCl
a: Michaelis Menten Darstellung ohne KCl mit
0,4 µM (●), 26 µM (○), 60 µM (▽) und 95 µM (□)
freiem Ca^{2+}, 0,55 mM freiem Mg^{2+} und 5 µg lösliches Enzym/Test
b: wie a) jedoch mit 20 mM KCl





35c: Lineweaver Burk Darstellungen zu 35a)
35d: Lineweaver Burk Darstellungen zu 35b)

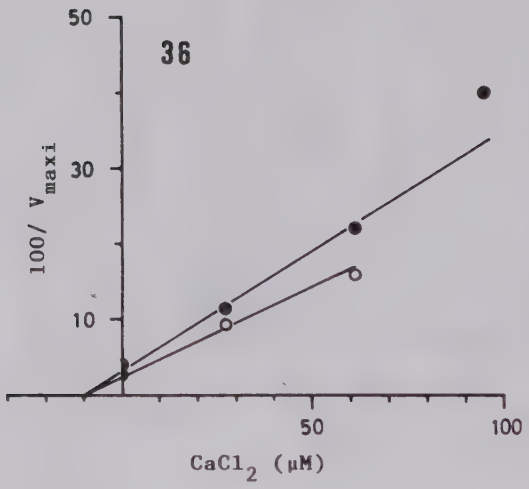


Abb. 36. K_i-Wert Bestimmung für Ca^{2+} in An- und Abwesenheit von 20 mM KCl
Die Daten dieser Darstellung wurden mit Hilfe der Darstellungen 35c und 35d ermittelt.
(●) = ohne KCl (○) = 20 mM KCl

DISKUSSION

Im Rahmen der Untersuchungen zur Neurobiologie der Reiz- und Erregungsleitung von Paramecium wurde eine in der Cilienmembran lokalisierte AC biochemisch untersucht und auf mögliche Regulationsmechanismen hin überprüft.
Zu Beginn der Arbeit war bekannt, daß diese AC mit MnATP als Substrat um den Faktor 10 aktiver war als mit der vergleichbaren Konzentration MgATP (21). Da MnATP in dieser Konzentration nicht das physiologische Substrat sein konnte, wurde nach Bedingungen gesucht, unter denen mit MgATP AC-Aktivitäten erzielt werden konnten, die mit den MnATP erhaltenen vergleichbar waren.
Erhebliche Schwankungen in den Ergebnissen machten es notwendig, die Stabilität unter den angewandten Inkubationsbedingungen zu überprüfen. Dabei wurde ersichtlich, daß während der Inkubationsdauer von 8 min bei 37°C ein Absinken der AC-Aktivität sehr wahrscheinlich war, da Vorinkubation unter diesen Bedingungen zu einem Verlust der AC-Aktivität bis zu 75 % führte.
Vorinkubationsdauer und Vorinkubationstemperatur hatten dabei einen entscheidenen Einfluß auf die Abnahme der AC-Aktivität. Da in Abhängigkeit von der Präparation nach Vorinkubation bei 30°C über einen Zeitraum von 20 min einmal kein Aktivitätsverlust und ein anderes Mal 60 % Aktivitätsverlust festgestellt wurde, war es wenig sinnvoll, die Inkubation bei einer niedrigeren Inkubationstemperatur durchzuführen. Aus diesem Grunde wurde nach Zusätzen gesucht, die die Stabilität des Enzyms über einen Zeitraum von 8 min unabhängig von der Präparation ermöglichten. Durch Zusatz von 30 % Glycerin wurde dieses Ziel erreicht. Glycerin führte dabei zu einer Erhöhung der Affinität des Enzyms zu MgATP und einer Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit. Da Glycerin mit MgATP als Substrat die AC wesentlich stärker aktivierte als mit MnATP als Substrat, konnten mit MgATP spezifische Aktivitäten erzielt werden, die in der Größenordnung derer lagen, die mit MnATP erhalten wurden.

Hormonsensitive ACen höherer Systeme bestehen häufig aus Rezeptor, den GTP bindenden Einheiten N_s und N_i und der katalytischen Einheit C zeigen folgende Eigenschaften:
1) GTP bzw. hydrolysestabile GTP Analoga wie GMPPNP und GTPγS stimulieren in An- oder Abwesenheit von Hormonen oder Neurotransmittern N_s oder N_i. Auf diese Weise stimuliertes N_s bzw. N_i führen zu einer Stimulierung bzw. einer Hemmung der AC-Aktivität (22).
2) NaF stimuliert diese ACen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von GTP, wobei die eigentliche Stimulierung über die Bildung von AlF_4^- an N_s und eine dadurch bedingte Stimulierung von N_s stattfinden soll (24).
3) N_s und N_i dienen als Substrat für die Adenoribosyltransferasen Cholera Toxin und Pertussis Toxin. Auf die α-Untereinheit von N_s wird dabei mittels Cholera Toxin, auf die von N_i mittels Pertussis Toxin von NAD ADP-Ribose übertragen, was in beiden Fällen zu einer Stimulierung der AC führt (44).
4) Forskolin, ein pflanzliches Diterpen, stimuliert die AC wahrscheinlich durch Bindung an die katalytische Untereinheit C (45, 53).

Die ciliäre Paramecium AC wird durch 100 µM GTP in Anwesenheit von 10 mM Na_2ATP zu 20 % gehemmt. NaF in einer Konzentration von 10 mM hemmt dieses Enzym in Anwesenheit von 8 mM $MgSO_4$ halbmaximal. Diese Hemmung beruht wahrscheinlich auf einer Beeinflußung der Mg^{2+}-Bindung an der allosterischen Bindungsstelle. Forskolin war nicht in der Lage, diese AC zu stimulieren. In Heidelberg wurden Versuche von Dr. Aktories mit Cilien und Cilienmembranvesikeln durchgeführt, die Auskunft über eine mögliche Anwesenheit von N_s und/oder N_i geben sollten. Cilien und Cilienmembranvesikel wurden mit ^{32}P-NAD und Cholera Toxin bzw. Pertussis Toxin behandelt. Nach anschließender Gelchromatographie und Autoradiographie war kein positiver Nachweis für die Anwesenheit der Untereinheit α_s von N_s und der Untereinheit α_i von N_i zu führen. Anwesenheit dieser Untereinheiten hätte unter diesen

Bedingungen zu einer Schwärzung der Autoradiographie in einem Molekulargewichtsbereich von 41 000 bis 45 000 führen müssen.

Alle diese Ergebnisse machten es unwahrscheinlich, daß auf die ciliäre Paramecien AC das Regulationsmodell hormonsensitiver ACen zu übertragen ist. Hingegen kristallisiert sich eine Verwandtschaft zu den nicht hormonregulierten ACen von Bakterien und Spermien heraus:

1) NaF-Hemmung wurde bislang für ACen von Trypanosoma brucei (49), E. coli (47) und Bordetella pertussis (48) beschrieben.

2) Forskolinstimulierung konnte weder für Dictyostelium discoideum (49), Leishmania (50) noch für ACen aus Spermien (52) nachgewiesen werden. Es wird vermutet, daß Bindung von N_s bzw. N_i und Forskolinbindung an die katalytische Einheit C in engem Zusammenhang stehen (45, 53). Fehlende Forskolinwirkung wäre in diesem Fall ein weiterer Anhaltspunkt dafür, daß ein anderer als der für die hormonsensitiven ACen beschriebener Regulationsmechanismus vorliegen muß.

3) Ein Einfluß von GTP konnte bislang nicht nachgewiesen werden auf die ACen der meisten Spermien (25), von Bordetella pertussis (48), Trypanosoma brucei (46) und Dictyostelium discoideum (51).

Über eine mögliche Regulation dieser Systeme herrscht weitgehend Unklarheit. Eine wesentliche Rolle scheint jedoch Ca^{2+} zu spielen. So ist für die lösliche AC von Bordetella pertussis eine Ca^{2+}/Calmodulin Abhängigkeit beschrieben worden (54, 55). Die AC in Plasmamembranen von Trypanosoma brucei wird durch hohe Ca^{2+}-Konzentrationen gehemmt (46), Konzentrationen von 100 µM Ca^{2+} stimulieren jedoch dieses Enzym, wenn in intakten permeabilisierten Zellen gemessen wird (56). Obwohl auch über die AC aus Spermien relativ wenig bekannt ist, konnte doch für die AC aus Meerschweinchenspermien eine Ca^{2+}-Stimulierung im micromolaren Bereich beobachtet werden. Durch Trifluperazin, einem Calmodulinantagonisten ist diese Stimulierung aufzuheben, ohne daß bislang eine Calmodulinabhängigkeit bewiesen werden konnte (25).

Nachgewiesen wurde sie für eine Spermien AC aus Abalone, einer Muschel (57).

Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten an, daß ionische Einflüße einen entscheidenen Einfluß auf die Regulation der ciliären Paramecien AC haben.
Es konnte gezeigt werden, daß die AC neben einer Bindungsstelle für MgATP eine weitere Bindungsstelle für Mg^{2+} besitzen muß. Das unterscheidet diese AC nicht von den ACen höherer Organismen (23, 60). Bindung von Mg^{2+} an diese Bindungsstelle ist Grundvoraussetzung für jegliche AC-Aktivität in den Cilien von Paramecium. Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration gegenüber MgATP führte dabei zu einer Erhöhung der Affinität des Enzyms für MgATP, so daß mit steigendem freien Mg^{2+} die halbmaximale Geschwindigkeit mit weniger ATP erreicht wurde. Diese Art der Regulation wird hier zum ersten Mal für eine AC beschrieben. Eine vergleichbare allosterische Aktivierung mit Mg^{2+} und MgATP wurde für eine Pyruvatcarboxylase beschrieben (58).
Die freie Mg^{2+}-Konzentration spielte eine entscheidende Rolle bei der Auffindung weiterer regulatorischer Vorgänge. So konnte bei submillimolaren Konzentrationen von freiem Mg^{2+} eine Ca^{2+}-Hemmung mit micromolaren Ca^{2+}-Konzentrationen festgestellt werden. Genauere kinetische Untersuchungen nach Berechnung der tatsächlich vorliegenden MgATP-Konzentrationen und der freien Ca^{2+} und freien Mg^{2+}-Konzentrationen beschrieben den sehr seltenen Fall einer unkompetitiven Hemmung. Ein weiteres Beispiel ist eine alkalische Phosphatase aus Rattendünndarm, die durch Phenylalanin unkompetitiv gehemmt wird (59). Bei diesem Hemmtyp kann der Inhibitor, hier also Ca^{2+}, nur dann an das Enzym binden, wenn Substrat gebunden hat und das Enzym somit in aktiviertem Zustand vorliegt. Die so ermittelten K_i-Werte liegen in einer Größenordnung von 10 - 20 µM Ca^{2+}, wenn die freie Mg^{2+}-Konzentration in einem Konzentrationsbereich von 0,5 - 1 mM liegt. Die interne Ca^{2+}-Konzentration, die bei der Depolarisierung erreicht wird, liegt in einem Konzentrationsbereich von bis

zu 40 µM (74), so daß theoretisch die AC bei der Depolarisierung während des Aktionspotentials abgeschaltet werden könnte. Hohe freie Mg^{2+}-Konzentrationen führen zu einer Verminderung der Ca^{2+}-Hemmung, wobei wahrscheinlich Mg^{2+} mit Ca^{2+} um die gleiche Bindungsstelle konkurriert.
Zum ersten Mal wird mit der ciliären Paramecium AC eine AC beschrieben, die hochspezifisch mit 10 - 20 mM KCl auf das 2 - 3-fache aktiviert werden kann.
Einflüße einwertiger Kationen sind immer wieder untersucht worden. So spielt Na^+ eine entscheidene Rolle bei der hormoninduzierten Hemmung der AC (61, 62). Bindung von Antagonisten an α_2-Rezeptoren und Opiatrezeptoren wird durch Na^+ erniedrigt (63).
Lediglich die ACTH-Stimulierung in Fettzellen kann mit 10 mM KCl um 20 % erhöht werden. Dieser Effekt ist durch hohe Na^+-Konzentrationen aufzuheben (64).
Auch in Cilienmembranvesikeln war die Stimulierung durch K^+ anfänglich sehr gering. Die AC-Aktivität stieg in Anwesenheit von 8 mM $MgSO_4$ und 1 mM ATP nur um ca. 30 %. In Cilien wurde unter diesen Bedingungen eine 1,8 - 2-fache Stimulierung erreicht. Der ursprüngliche Verdacht, daß während der Präparation der für die K^+-Stimulierung verantwortliche Teil verloren geht, ließ sich nicht erhärten.
Hingegen stellte sich auch hier heraus, daß die Mg^{2+}-Konzentration wesentlich die Höhe der K^+-Stimulierung beeinflußte. Steigende Konzentrationen von freiem Mg^{2+} führten zu einer kontinuierlichen Abnahme der K^+-Stimulierung. K^+-Effekte, die mit $MnCl_2$ als Kofaktor gemessen wurden, waren zum einen nicht mehr spezifisch und zum anderen zu höheren K^+-Konzentrationen hin verschoben. Eine weitere Beeinflußung der K^+-Stimulierung durch andere Ionen in einem physiologischen Konzentrationsbereich konnte nicht gefunden werden. So waren die K_i-Werte für Ca^{2+} in An- und Abwesenheit von K^+ völlig identisch. Erst hohe Ca^{2+}-Konzentrationen (96 µM) führten zu einer Aufhebung der K^+-Stimulierung. Auch Anwesenheit von NaCl veränderte die K^+-Stimulierung nicht.
Kinetische Messungen zeigten, daß K^+ lediglich V_{max} erhöhte

und den K_m^A-Wert nicht beeinflußte. Da hier der K_A-Wert für Mg^{2+} direkt abhängig von dem K_m^A-Wert war, wurde auch der K_A-Wert nicht verändert. Dies schließt eine K^+-Bindung an der Mg^{2+}-Bindungsstelle aus und legt die Existenz einer gesonderten K^+-Bindungsstelle nahe. Vorstellbar ist, daß bei einem Mg^{2+}-Überschuß Mg^{2+} an diese K^+-Bindungsstelle bindet und so eine K^+-Bindung erschwert. In diesem Fall müßte eine Erhöhung der K^+-Konzentration zu einer höheren K^+-Stimulierung führen. Das Maximum der K^+-Stimulierung lag allerdings unabhängig von der freien Mg^{2+}-Konzentration immer zwischen 10 und 20 mM KCl. Hohe freie Mg^{2+}-Konzentrationen müssen daher zu einer Veränderung führen, die durch Erhöhung von K^+ nicht zu kompensieren ist. Ob dabei die K^+-Bindungsstelle beeinflußt wird oder die Erniedrigung der Maximalgeschwindigkeit über einen anderen Mechanismus erfolgt, bleibt dahingestellt.

Die Funktion von cAMP in den Cilien von Paramecium ist noch nicht geklärt und bietet einen Spielraum für weitläufige Spekulationen. Interessanterweise wird eine Erhöhung von cAMP in Spermien mit einer größeren Beweglichkeit in Zusammenhang gebracht (25). In Paramecium führt Hyperpolarisation der Membran zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz (8). Da eine Erhöhung von cAMP zu einer Erhöhung, eine Erniedrigung von cAMP zu einem Absinken der Schlaggeschwindigkeit führen soll, wird spekuliert, daß die Regulation des cAMP-Spiegels über das Membranpotential erfolgt (19). Da diese Daten über Messungen des cAMP-Spiegels in ganzen Tieren erhalten wurden, ist es schwierig, die ciliäre Paramecium AC hier einzuordnen. Angaben über Hyperpolarisation und Depolarisation betreffen in erster Linie die somatische Membran. Zu klären wäre hier, ob in gleicher Weise das Potential der ciliären Membran verändert wird. In diesem Fall könnte durch das Ansteigen der internen Ca^{2+}-Konzentration während der Depolarisation die AC abgeschaltet werden; Absinken der internen Ca^{2+}-Konzentration hätte eine Aufhebung der Hemmung der AC und somit ein Ansteigen der cAMP-Spiegel zur Folge. Hyperpo-

larisation der Membran erfolgt durch erhöhten K^+-Ausstrom. Verantwortlich dafür sind 3 verschiedene Kaliumkanäle, die zum einen über das Membranpotential, zum anderen über die interne Ca^{2+}-Konzentration reguliert werden (74). Hierbei wird lokal in der Membran die K^+-Konzentration stark ansteigen und unter Umständen durch Bindung an die spezifische K^+-Bindungsstelle der AC zu einer erhöhten AC-Aktivität führen, was wiederum mit den erhöhten cAMP-Spiegeln während der Hyperpolarisation in Einklang zu bringen wäre.
Bei unseren cAMP-Spiegelmessungen in vivo wurde eine Erhöhung der cAMP-Spiegel mit Mg^{2+}, Ca^{2+} und Sr^{2+} gefunden. Diese Ionen führen alle zu einer Beschleunigung des Vorwärtsschwimmens, was in der Elektrophysiologie mit einer Membranhyperpolarisation verbunden wird. Die erhöhten cAMP-Spiegel konnten allerdings erst bei Ionenkonzentrationen gemessen werden, bei denen die maximale Schwimmgeschwindigkeit bereits erreicht war (65). Weiterhin sollen diese Ionenkonzentrationen nach Naitoh zu einer Depolarisation der Membran führen (66, 67).
Wesentlichen Einfluß auf die Höhe der cAMP-Spiegel hatte das Donnan-Verhältnis von $K^+/\sqrt{Ca}^{2+}$. cAMP-Spiegel wurden erhöht, wenn dieses Donnan-Verhältnis gegenüber dem des Equilibrierungspuffers maximal verändert wurde. Diese maximale Veränderung führte zu einer Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit, die mit kleiner werdenden Differenzen abnahm (65). Die Ergebnisse sind mit den bisher erhaltenen Daten über Stimulierung und Hemmung der AC noch nicht zu korrelieren. Unklar ist, wie das $K^+/\sqrt{Ca}^{2+}$-Verhältnis von der Membran erkannt wird, wie sich das Membranpotential verändert und welche ionischen Veränderungen aufgrund dieses Signals stattfinden, die dann wiederum zu einer Stimulierung der AC führen.

Zur Aufklärung der Frage, welche Rolle die AC in der Cilienmembran und somit die Höhe des gebildeten cAMP's spielt, könnten zwei Richtungen verfolgt werden:

1) Reinigung der ciliären AC und Herstellung von Antikörpern

Die ersten Schritte in Richtung Reinigung wurden mit dieser Arbeit gemacht. So liegt das Enzym in löslicher Form vor und kann mittels Gelchromatographie weiter aufgereinigt werden. Mit Glycerin ist ein Stabilisator vorhanden, der hoffen läßt, daß das Enzym weitere Reinigungsschritte überstehen wird. Mit der gereinigten AC wäre es dann möglich, Antikörper herzustellen und diese in intakte Paramecien zu injezieren. Vorausgesetzt, daß diese Antikörper die AC in der Cilienmembran erreichen und hemmen, sollte dann über Verhaltensbeobachtungen nach verschiedenen Stimulierungen eine Aussage über die Funktion der AC innerhalb der Reizantwort möglich sein. Auch ein Einbau der gereinigten AC in Liposomen wäre denkbar. Messungen der AC bei definierten Membranpotentialen sollten eine Aussage über eine möglich Regulation der AC durch das Membranpotential ermöglichen. Weiterhin könnte die Untersuchung der Lipidzusammensetzung und somit der Einfluß der Membranfluidität auf die AC neue Erkenntnisse über das Zuammenspiel von Enzymaktivität und Membranstruktur liefern.

2) Charakterisierung der AC in Mutanten

Es liegen eine Anzahl von Mutanten vor, die Mutationen bezüglich verschiedener Ionenleitfähigkeiten aufweisen. Von Interesse sind folgende Mutanten:

a) Ca^{2+}-Kanalmutanten

Hierzu zählen die 'Pawns' und der 'Dancer'. Die 'Pawns' sind nicht mehr zur Ausbildung von Aktionspotentialen und somit zur Cilienschlagumkehr befähigt. Die Mutation betrifft den spannungsabhängigen Ca^{2+}-Einstrom in der Cilienmembran. Die Ca^{2+}-Kanalmutante 'Dancer' weist einen erhöhten Ca^{2+}-Einstrom auf und tendiert zu einem Alles oder Nichts-Aktionspotential. Der Ca^{2+} induzierte K^{+}-Ausstrom ist erhöht.

b) 'Paranoiac'

Diese Mutanten zeigen elektrophysiologisch eine verlängerte De- und eine verlangsamte Repolarisation. Die verlängerte Depolarisation soll dabei eine Folge des erhöhten Ca^{2+} induzierten Na^{+}-Einstroms sein (75).

c) K^{+}-resistente Mutanten

Im Gegensatz zum Wildtyp überleben diese Mutanten K^{+}-Konzentrationen im Außenmedium bis zu 35 mM. Verhaltensphysiologisch zeigen sie keine Adaptation mehr. Unter Adaptation versteht man den Verlust zur Bildung von Aktionspotentialen auf bestimmte Reize hin (78).

d) Kalium-Kanalmutanten

Hierzu zählen die Mutanten 'Fast 2', die TEA^{+}-insensitiven Mutanten und die 'Pantophobiacs'. 'Fast 2' und die TEA^{+} insensitiven Mutanten besitzten eine erhöhte K^{+}-Leitfähigkeit, die jedoch nur bei 'Fast 2' Mutanten durch Zugabe von TEA^{+} wieder aufzuheben ist (78). Bei den 'Pantophobiacs' findet man keinen Ca^{2+} induzierten K^{+}-Astrom. Der potentialabhängige K^{+}-Ausstrom ist dagegen nicht verändert.

Mit der Untersuchung der ciliären AC vor allem in den K^{+}-Kanalmutanten sollte sich klären lassen, ob dieses Enzym direkt an der Regulation des K^{+}-Ausstroms beteiligt ist und somit mitverantwortlich für eine Membranhyperpolarisation ist. In Verbindung mit den Untersuchungen in den weiter aufgeführten Mutanten sollten Aussagen über einen denkbaren Zusammenhang zwischen Membranpotential und Regulation der ciliären AC möglich sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine in der Cilienmembran von Paramecium tetraurelia Wildtyp 51s lokalisierte AC wurde biochemisch charakterisiert und auf mögliche Regulationsmechanismen überprüft. Zu diesen Studien wurden Cilien, Cilienmembranvesikel und lösliches Enzym herangezogen.

Die AC kann sowohl MnATP als auch MgATP als Substrat verwenden. Die K_m-Werte sind mit 90 µM (MnATP) und 200 µM (MgATP) unterschiedlich. Mit MgATP als Substrat und in Anwesenheit von 20 - 30 % Glycerin werden spezifische Aktivitäten erreicht, die denen mit MnATP unter gleichen Bedingungen entsprechen, wenn man die unterschiedliche Affinität der beiden Substrate zu dem Enzym berücksichtigt. Aktivierungsenergie und pH-Abhängigkeit sind mit beiden Substraten gleich.

Das Enzym liegt in löslicher Form vor. Mittels Gelchromatographie ist eine ca. 20-fache Anreicherung der AC aus Cilien möglich.

Es liegen keine Anhaltspunkte für eine Regulation vor, die mit der von hormonsensitiven ACen zu vergleichen wäre. Forskolin und GTP haben keinen entscheidenen Einfluß auf die AC-Aktivität und NaF hemmt dieses Enzym.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß diese AC ionisch reguliert wird:

1) Das Enzym besitzt eine zweite Bindungsstelle für Mg^{2+}, deren Besetzung notwendig für jegliche Enzymaktivität ist. Bindung von Mg^{2+} an diese Stelle führt zu einer Erhöhung der Affinität des Enzyms zu MgATP.

2) Dieses Enzym wird durch Ca^{2+} gehemmt. Die Ca^{2+}-Hemmung wird dabei von freiem Mg^{2+} antagonisiert. Der Hemmtyp entspricht der einer unkompetitiven Hemmung.

3) Die Aktivität der AC wird hochspezifisch durch K^+ erhöht. Diese Aktivierung wird durch Na^+ nicht beeinflußt. Maximale Werte werden mit 10 - 20 mM KCl erreicht, wobei die Höhe abhängig von der freien Mg^{2+}-Konzentration ist. Hohe Konzentrationen freies Mg^{2+} führen zu einer Erniedrigung der K^+-Aktivierung.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Van Wagtendonk, W. J.: Paramecium, a current survey Elsevier scientific publishing company (1974)

2) Eckert R., Brehm P. (1979): Ann. Rev. Biophys. 8, 853-883

3) Nelson D., Kung C. (1978): Taxis a. Behavior (Receptors and Recognition, Serie B, Vol. 5, Hatzelbauer G.L. ed.) Chapman and Hall London 77-100

4) Jennings H. S. (1904): Comp. Neurol. 14, 441-451

5) Kung C., Chang C.Y., Satow Y., van Houten J., Hansma J, (1975): J. Sci. 188, 898-904

6) Ogura A., Machemer H. (1980): J. Comp. Physiol. 135, 233-242

7) Naitoh Y., Keneko H. (1978) : J. Exp. Biol. 58, 657-676

8) Brehm P., Eckert R. (1978): Science (Wash. DC) 202, 1203-1206

9) Doughty M.J., Kaneshiro E.S. (1983): J. Protozool. 33, 565-573

10) Riddle M.L., Rauh J.J., Nelson D.L. (1982): Biochim. Biophys. Acta 688, 525-540

11) Nakaoka Y., Oka T., Serizawa K., Toyotoma H., Oosawa F. (1983): Cell Struct. Funkt. 8, 77-84

12) Nakaoka Y., Tanaka H., Oosawa F. (1984): J. Cell Sci. 650, 223-231

13) Klumpp S., Kleefeld G., Schultz J.E. (1983): J. Biol. Chem. 258, 12455-12459

14) Schultz J.E., Jantzen H.M. (1980): FEBS Letters 116, 75-78

15) Eistetter H., Seckler B., Bryniok D., Schultz J.E. (1983): Eur. J. Cell Biol. 31, 220-226

16) Klumpp S., Steiner A.L., Schultz J.E. (1983): Eur. J. Cell Biol. 32, 164-170

17) Mannek H.E.: Diplomarbeit Tübingen (1985)

18) Schultz J.E., Grünemund R., von Hirschhausen R., Schönefeld U. (1984): FEBS Letters 167, 114-116

19) Gustin M.C., Bonini N., Nelson D.L. (1983): Neurosci. Abs. 9 (1), 167

20) Schultz J.E., Boheim G., Gierlich D., Hanke W., v.Hirschhausen R., Kleefeld G., Klumpp S., Otto M.K., Schönefeld U. (1984): in Hormones and Cell Regulation Vol.8, 99-113

21) Schultz J.E., Klumpp S. (1983): FEBS Letters 154, 347-350

22) Jakobs K.H., Schultz G., Gaugler B., Pfeuffer T. (1983): Eur. J. Biochem. 134, 351-354

23) Birnbaumer L. (1973): Biochim. Biophys. Acta 300, 129-158

24) Sternweis P.C., Gilman A.G. (1982): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4888-4891

25) Garbers D.L., Kopf G.S. (1980): Adv. Cyclic Nucleotide Res. 13, 251-306

26) Wolff J.C., Cook H.G. (1982): Archiv Biochem. Biophys. 215, 524-531

27) Voorheis H.P., Martin R. (1981): Eur. J. Biochem. 114, 471-477

28) Peterkofsky A. (1981): Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14, 215-228

29) Thiele J., Honer-Schmid O., Wahl G., Kleefeld G., Schultz J.E. (1980): J. Protozool. 27, 118-121

30) Gibbons J.R. (1965): Arch. Biol. (Liege) 76, 317-353

31) Gibbons J.R. (1969): J. Cell Biol. 25, 400-402

32) Adoutte A., Ramathan R., Lewis R.W., Dute R.R., Link Y., Kung C., Nelson D.L. (1980): J. Cell Biol. 84, 711-738

33) Gerzer R., Hofmann F., Schultz G. (1981): Eur. J. Biochem. 116, 479-486

34) Salomon Y., Londos C., Rodbell M. (1974): Anal. Biochem. 58, 541-548

35) Randerath K., Randerath H. (1964): J. Chrom. 16, 111-129

36) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951): J. Biol. Chem. 193, 265-275

37) Klumpp S.: Dissertation Tübingen 1982

38) Rosenzweig Z., Kindler S.H. (1972): FEBS Letters 25, 221-223

39) Murad F., Kimura H. (1974): J. Biol. Chem. 249, 329-331

40) Stengel D., Guenett L., Hanoune J. (1982): J. Biol. Chem. 257, 10818-10826

41) Klumpp S., Gierlich D., Schultz J.E. (1984): FEBS Letters 171, 95-99

42) Segel J.H.: Enzyme Kinetics (1975) Wiley Interscience Publication

43) Ahlers J., Arnold A., Döhren R., Peter H.W.: Enzymkinetik, Gustav Fischer Verlag Stuttgart/New York 2. Auflage (1982)

44) Gilman A.G. (1984): Cell 36, 577-579

45) Seamon K.B., Vaillantcourt R., Edwards M., Daly J.W. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci.USA 81, 5081-5085

46) Martin B.R., Voorheis H.P., Kennedy E.L. (1978): Biochem. J. (1978): 175, 207-212

47) Tao M., Lippmann F. (1969): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 86-92

48) Hewlett E.L., Wolff J.C. (1976): J. Bacteriol. 127, 880-898

49) Brenner M., Padh H. (1983): J. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphoryl. Res. 9, 297-303

50) Walter R. D., Slutzky G.M., Greenblatt C. (1982): Tropenmed. Parasitol. 33, 137-139

51) Devreotes P.N. (1983): Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphoryl.Res. 15, 55-96

52) Forte L.R., Bylund D.B., Zahler W.L. (1983): Mol. Pharmacol. 24, 42-47

53) Awad J.A., Johnson R.A., Jakobs K.H., Schultz G. (1983): J. Biol. Chem. 258, 2960-2965

54) Wolff J.C., Cook G.H., Goldhammer A.R., Berkowitz S.A. (1980): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3841-3844

55) Goldhammer A.R., Wolff J.C., Cook G.H., Berkowitz S.A., Klee C.B., Manclark C.R., Hewlett E.L. (1981): Eur. J. Biochem. 115, 605-609

56) Voorheis P.R., Martin B.R. (1980): Eur. J. Biochem. 113, 223-227

57) Kopf G.S., Vacquier V.D. (1984): J. Biol. Chem. 259, 7590-7596

58) Keech B., Barritt G.J. (1967): J. Biol. Chem. 242, 1983-1987

59) Ghosh N.K., Fishman W. (1966): J. Biol. Chem. 241, 2516-2522

60) Garbers D.L., Johnson R.A. (1975): J. Biol. Chem. 250, 2516-2522

61) Jakobs K.H., Gehring U., Gaugler B., Pfeuffer T., Schultz G. (1981): Adv. Cyclic Nucleotide Res. 130, 173-187

62) Cooper D.M.F. (1982): FEBS Letters 138, 157-163

63) Hofmann B., Lefkowitz R.J. (1980): Ann. Rev. Pharmacol. Toxic. 20, 581-608

64) Birnbaumer L., Pohl L., Rodbell M. (1969): J. Biol. Chem. 244, 3468-3476

65) Grünemund R.: Diplomarbeit 1984, Tübingen

66) Naitoh Y., Eckert R. (1968): Z. vergl. Physiol. 61, 427-452

67) Naitoh Y., Eckert R. (1968): Z. vergl. Physiol. 61, 453-472

68) Fabiato A., Fabiato F. (1979): J. Physiol. (Paris) 75, 463-505

69) Roy C., Bary L., Jard S. (1977): Eur. J. Biochem. 75, 325-332

70) Katz M.S., Kelly T.M., Pineyro M.A., Gregermann R.I. (1980): Biochim. Biophys. Acta 632, 11-25

71) Johnson R.A., Pilkis S.J., Hamet P.(1975): J. Biol. Chem. 250, 6599-6607

72) Kalish M.I. (1974): Biochem. Biophys. Research Commun. 61, 781-787

73) Svoboda M., Christophe J. (1978): FEBS Letters 86, 230-234

74) Kung C., Saimi Y. (1982): Ann. Rev. Physiol. 44, 519-534

75) Hinrichsen R.D., Saimi Y. (1984): J. Physiol. 351, 397-410

76) Saimi Y., Kung C. (1980): J. Exp. Biol. 88, 305-325

77) Saimi Y., Hinrichsen R.D., Forte M., Kung C. (1983): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5112-5116

78) Shusterman C.L., Thiele E.W., Kung C. (1978): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5645-5649

79) Metzger H., Lindner E. (1981): IRCS Med. Sci. Libr. Compend. 9, 99

80) Metzger H., Lindner E. (1981): Arzneim. Forsch. 31, 1248-1250

81) Seamon K., Daly J.W. (1981): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3363-3367

82) Seamon K., Daly J.W. (1981): J. Biol. Chem. 256, 9799-9801

83) Johnson R.A., Awad J.A., Steinmayer C., Schultz G. (1982): Naunyn Schmiedeberg's Archiv Pharmacol. 319, R28

84) Peterson G.L. (1977): Anal. Biochem. 83, 346-356

85) Aktories K., Schultz G., Jakobs K.H. (1983): FEBS Letters 158), 169-173

86) Brandt D.R., Asano T., Pedersen S.E., Ross E.M. (1983): Biochemistry 22, 4357-4362

87) von Hirschhausen H.R.: persönliche Mitteilung

Lebenslauf

Doris Gertrud Gierlich, geboren am 7.6.1958 in Bergisch Gladbach, Tochter des Buchhalters Johannes Gierlich und dessen Ehefrau Apollonia Gierlich, geb. Ossenbach.

1964 - 1968	Besuch der Volksschule Bergisch Gladbach-Gronau
1968 - 1977	Besuch des Nicolaus Cusanus Gymnasiums in Bergisch Gladbach
Juni 1977	Abitur
September 1977 - März 1978	Studium der Biologie und Chemie an der Universität Köln
April 1978 - September 1978	Studium der Pharmazie an der Universität Heidelberg
Oktober 1978 - Oktober 1981	Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen
März 1980	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1981	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1981 - Oktober 1982	Pharmaziepraktikum in der Apotheke 'Am Lustnauer Tor' in Tübingen
Oktober 1982	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 1982	Erteilung der Approbation
November 1982	Beginn der vorliegenden Arbeit
Mai 1985	Beendigung der vorliegenden Arbeit

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

Alexander, Ammon, Auterhoff, Bergmann, Butenhard, Egelhaaf, Graf, Haxel, Kovar, Kruck, Neidlein, Reichling, Reinhard, Schilcher, Schultz und Verspohl.

ifo druck
Laubanger 15
8600 Bamberg
Telefon 0951/64321